CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅳ活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1881　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

	适用样本：动植物组织和细胞
	保质期：-20℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

线粒体呼吸链复合体Ⅳ（EC 7.1.1.9）又称细胞色素 C 氧化酶，也是线粒体电子传递呼吸链主路和支路的共有成分，负责催化还原型细胞色素 C 的氧化，并最终把电子传递给氧，生成水。

本试剂盒检测原理是还原型细胞色素 C 在 550 nm 有特征光吸收，线粒体呼吸链复合体Ⅳ催化还原型细胞色素 C 生成氧化型细胞色素 C，通过检测 550 nm 光吸收下降速率即可计算出样本中线粒体呼吸链复合体Ⅳ活性。

本试剂盒通过精准调控酶促反应动力学，有效延长反应的持续时间，消除了样本加样时间差带来的结果偏差，并提供了充裕的加样缓冲时间；同时采用预混工作液设计进一步简化操作。本试剂盒可适配高通量批量样本检测，全方位解决了线粒体呼吸链复合体的检测难点。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Reagent Ⅰ	60 mL	60 mL×2	4℃
Reagent Ⅱ	30 mL	60 mL	4℃
Reagent Ⅲ	25 mL	40 mL	4℃
Reagent Ⅳ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存
Reagent Ⅴ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

***本试剂盒额外提供了足量试剂用来填补由于工作液粘度大造成的损耗。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 550 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通酶标板
其他	匀浆器或研钵、恒温箱、冰盒、低温离心机、可调节式移液器及吸头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

注意：Reagent Ⅲ粘度较大，为保证吸量准确，在准备及工作液时，用移液器吸取 Reagent Ⅲ前，应先润洗吸头 1 次，然后再准确吸取所需量的试剂。Reagent Ⅲ及工作液在使用前，需注意轻轻上下颠倒混合均匀，避免剧烈摇晃，以免产生大量气泡。

（提示：润洗时，将移液器按钮按压至第一停点（吸取档），缓慢地吸取所要量取的试剂，将吸头移出液面，缓慢地将按钮按压至第一停点（注意不要按压至第二停点），将吸头内的试剂全部排回原容器。）

试剂名称	试剂准备	注意事项
Reagent Ⅰ	即用型	实验过程中冰上放置；4℃保存。
Reagent Ⅱ	即用型	实验过程中冰上放置；4℃保存。
Reagent Ⅲ	即用型；使用前平衡到室温。	4℃保存；**若使用前试剂未解冻，建议 80℃水浴加热至完全溶解，恢复至室温再使用。**
Working Reagent Ⅳ	临用前配制；96T 用 2 mL 去离子水充分溶解；48T 用 1 mL 去离子水充分溶解	未用完的试剂 4℃避光可保存 3 天，分装后-20℃避光保存 1 个月，禁止反复冻融。
Working Reagent Ⅴ	临用前配制；用 2 mL 去离子水充分溶解	未用完的试剂 4℃避光可保存 3 天，分装后-20℃避光保存 1 个月，禁止反复冻融。

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取，如果不能马上使用，则把完整细胞或者分装的组织保存在-80℃，一个月内使用。样本提取用 Reagent Ⅱ重悬后，尽量当天检测，如果当天不能检测，可置于-20℃冻存 1 天。该试剂盒提取的样本也可以适用于 KTB1851、KTB1861、KTB1871 和 KTB1891 试剂盒（具体操作详见 FAQ）。

- **动植物组织或细胞样本**：

1. 称取约 0.1 g 组织样本或收集 5×10^6 个细胞，加入 1 mL Reagent Ⅰ，用匀浆器或研钵冰浴匀浆（**建议手动匀浆。如果一次性处理的样本数较多，可以使用机械匀浆（冰浴）提高效率，推荐参数设置为 40 Hz，匀浆 20 s，间隔 10 s，重复 3 次（3 mm 钢珠 2-3 颗）。植物样本直接进行机械匀浆可能存在酶活损失的情况，建议结合自身设备情况进行预实验评估或采用手动匀浆的方式。细胞样本也可采用冰浴超声波破碎处理，推荐参数设置为功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，超声 5 min。**）。

2. 离心匀浆液，4℃，600 g，离心 5 min，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀。

3. 再次离心上清，4℃，11000 g，离心 10 min，沉淀即为提取的线粒体，用作第 5 步操作。

4. 上清液即为胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的线粒体呼吸链复合体Ⅳ（此步可选做，可用于判断线粒体提取效果）。

5. 在沉淀中加入 400 μL Reagent Ⅱ，**用移液器吹起沉淀并小心吹打，充分重悬沉淀（避免用涡旋混匀仪剧烈混匀以免破坏复合体，后续步骤可使用涡旋混匀仪轻柔混匀）**，经第 6 步操作后置于冰上待测。

6. **样本的稀释**

在正式检测前，需选择 2-3 个预期差异大的样本用 Reagent Ⅱ稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，选择合适的稀释倍数，参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数	样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
细胞样本	不稀释	小鼠脾脏组织	1-2	兔心脏组织	2-5	兔肺脏组织	1-2
小鼠心脏组织	8-10	小鼠肺脏组织	1-2	兔脑组织	5-10	兔肾脏组织	5-10
小鼠脑组织	5-10	小鼠肾脏组织	5-10	兔肝脏组织	2-5	兔肌肉组织	不稀释
小鼠肝脏组织	8-10	小鼠肌肉组织	1-2	兔脾脏组织	1-2	植物组织	不稀释

05-3 实验步骤

注意：工作液粘度较大，吸取 200 μL 工作液时需将吸头用工作液润洗一遍（润洗后吸头会有工作液残留，加样时无需将残留工作液挤出），小心操作，以免产生气泡影响检测结果。样本尽量加到每个孔的底部中间位置，工作液需垂直加到每个孔的中间位置，避免贴壁加入。

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 550 nm。

2. **工作液配制**：按照每孔 201.9 μL（Reagent Ⅲ **183 μL**：Working Reagent Ⅳ **12.6 μL**：Working Reagent Ⅴ **6.3 μL**，配制体积比 **29：2：1**）配制工作液，混合均匀。**使用前置于 37℃孵育 5 min。由于试剂粘度大会产生一定的损耗，建议比需求量多配制 20%左右。**现用现配，密封避光保存。

3. **检测体系配制**：96 孔板中依次加入 10 μL 样本和 200 μL 工作液，**在 10 min 内完成全部加样操作不会影响检测结果。**检测量大时，建议使用多通道移液器操作以提高加样速度。**反应仅在振荡后才会启动，因此，在开始检测前请勿振荡孔板。**

4. **吸光度检测：读取 550 nm 处 0 min 时的吸光值 A_1，然后静置 30 s，之后振荡 30 s 并检测吸光值 A_2。**

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn]进入“**技术中心**”查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A=A_1-A_2$，$\Delta A_{上清}=A_{1\,上清}-A_{2\,上清}$，$\Delta A_{沉淀}=A_{1\,沉淀}-A_{2\,沉淀}$。

2. 样本线粒体呼吸链复合体Ⅳ活力计算

- 按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化降解 1 nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

上清中复合体Ⅳ活性(U/g)=$[\Delta A_{上清}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times 10^9]\div(W\div V_{提取}\times V_{样})\div T$**=2199×ΔA $_{上清}$÷W**

沉淀中复合体Ⅳ活性(U/g)=$[\Delta A_{沉淀}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times 10^9]\div(W\div V_{重悬}\times V_{样})\div T$**=880×ΔA $_{沉淀}$÷W**

线粒体呼吸链复合体Ⅳ总活性(U/g) **=2199×ΔA $_{上清}$÷W+880×ΔA $_{沉淀}$÷W**

- 按细胞数量计算:

单位的定义：每 10^4 个细胞每分钟催化降解 1 nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

上清中复合体Ⅳ活性(U/10^4)=$[\Delta A_{上清}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times 10^9]\div(V_{样}\div V_{提取}\times N)\div T$**=2199×ΔA $_{上清}$÷N**

沉淀中复合体Ⅳ活性(U/10^4)=$[\Delta A_{沉淀}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times 10^9]\div(V_{样}\div V_{重悬}\times N)\div T$**=880×ΔA $_{沉淀}$÷N**

线粒体呼吸链复合体Ⅳ总活性(U/10^4) **=2199×ΔA $_{上清}$÷N+880×ΔA $_{沉淀}$÷N**

$V_{反总}$：反应体系总体积，2.1×10^{-4} L；ε：细胞色素 C 摩尔消光系数，19.1×10^3 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；10^9：单位换算系数，1 mol=10^9 nmol；$V_{样}$：加入样本体积，0.01 mL；T：反应时间，1 min；W：样本质量，g；$V_{提取}$：提取体系体积，1 mL；$V_{重悬}$：重悬沉淀体积，0.4 mL；N：细胞数量，以 10^4 为单位（如细胞数量为 5×10^6，N=500）。

07 结果展示

示例-1:取 0.1 g 小鼠肝脏组织样本，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{上清}=A_{1\,上清}-A_{2\,上清}$=0.462-0.450=0.012，用 Reagent Ⅱ稀释 10 倍的$\Delta A_{沉淀}=A_{1\,沉淀}-A_{2\,沉淀}$=0.440-0.385=0.055，按样本质量计算得：上清中线粒体呼吸链复合体Ⅳ活性(U/g)=$2199\times\Delta A_{上清}\div W=2199\times0.012\div0.1=263.88$ U/g，稀释 10 倍的沉淀中线粒体呼吸链复合体Ⅳ活性(U/g)=$880\times\Delta A_{沉淀}\div W=880\times0.055\div0.1=484.00$ U/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本ΔA 过高或者过低怎么办?**

如果样本的ΔA>0.1，将样本用 Reagent Ⅱ进行稀释后，再进行检测。若样本较浑浊或颜色太深可能干扰检测，建议用 Reagent Ⅱ适当稀释再进行检测。如果样本的ΔA<0.01，可适当增加加入的样本体积或提高样本量（组织克重或者细胞数量），或者减少提取液用量。若ΔA 出现负值，则说明样本中不含线粒体呼吸链复合体Ⅳ或已降解。

- **同一样本，KTB1851、KTB1861、KTB1871、KTB1881 和 KTB1891 试剂盒都能检测，如何操作?**

1. KTB1851、KTB1861、KTB1871、KTB1881 和 KTB1891 试剂盒的 Reagent Ⅰ和 Reagent Ⅱ可以分别互换使用，可任选其中一个试剂盒的 Reagent Ⅰ和 Reagent Ⅱ来制备样本。

2. 称取约 0.1 g 组织样本或收集 5×10^6 个细胞，加入 1 mL Reagent Ⅰ，用匀浆器或研钵冰浴匀浆（建议手动

匀浆。如果一次性处理的样本数较多，可以使用机械匀浆（冰浴）提高效率，推荐参数设置为 40 Hz，匀浆 20 s，间隔 10 s，重复 3 次（3 mm 钢珠 2-3 颗）。植物样本直接进行机械匀浆可能存在酶活损失的情况，建议结合自身设备情况进行预实验评估或采用手动匀浆的方式。细胞样本也可采用冰浴超声波破碎处理，推荐参数设置为功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，超声 5 min。）。

3. 离心匀浆液，4℃，600 g，离心 5 min，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀。

4. 再次离心上清，4℃，11000 g，离心 10 min，沉淀即为提取的线粒体，用作第 6 步操作。

5. 上清液即为胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的线粒体呼吸链复合体Ⅰ-Ⅴ（此步可选做，可用于判断线粒体提取效果）。

6. 在沉淀中加入 200 μL Reagent Ⅱ，用移液器吹起沉淀并小心吹打，充分重悬沉淀（避免用涡旋混匀仪剧烈混匀以免破坏复合体，后续步骤可使用涡旋混匀仪轻柔混匀），经第 7 步操作后置于冰上待测。

7. 检测复合体Ⅰ、复合体Ⅱ、复合体Ⅲ时，分别按 KTB1851、KTB1861、KTB1871 说明书的推荐稀释倍数用 Reagent Ⅱ进行样本的稀释；检测复合体Ⅳ时，先用 Reagent Ⅱ稀释 2 倍后再根据 KTB1881 说明书的推荐稀释倍数用 Reagent Ⅱ进行样本的稀释；检测复合体Ⅴ时，用 Reagent Ⅱ稀释 4 倍后直接用于检测。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1851	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅰ活性检测试剂盒（微量法）
KTB1861	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅱ活性检测试剂盒（微量法）
KTB1871	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅲ活性检测试剂盒（微量法）
KTB1891	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅴ活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体IV活性检测流程示意图

（Abbkine 货号 ： KTB1881）

样本处理





称取约 0.1 g 组织样本加入1 mL Reagent Ⅰ，用匀浆器或研钵冰浴匀浆



收集清洗的细胞加入1 mL Reagent Ⅰ，用匀浆器或研钵冰浴匀浆



600 g，4℃离心5 min，取上清至新离心管中。11000 g，4℃离心10 min，分别保留上清和沉淀

400 μL Reagent Ⅱ重悬沉淀（建议用移液器吹打重悬）置冰上待测



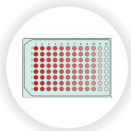
体系配置

工作液的配制：
临用前按照每孔201.9 μL（Reagent III 183 μL：Working Reagent IV 12.6 μL：Working Reagent V 6.3 μL，配制体积比29：2：1）配制工作液，混合均匀，37℃孵育5 min后使用。



样本	10 μL
工作液	200 μL

在10 min内完成全部加样操作不会影响检测结果
反应仅在振荡后才会启动，因此，在开始检测前请勿振荡孔板



数据检测

读取550 nm处0 min时的吸光值A1，然后静置30 s，之后振荡30 s并检测吸光值A2
结果计算