CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅲ活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1871　　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Ⅲ（EC 7.1.1.8）又称 CoQ-细胞色素 C 还原酶，广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体中，是线粒体呼吸电子传递链主路和支路的共有成分，负责把还原型 CoQ 的氢传递给细胞色素 C，生成还原型细胞色素 C。线粒体呼吸链复合体Ⅲ是一个多亚基的膜蛋白质复合体，它是参与光合作用和呼吸电子传递链的一个基本组分。

本试剂盒检测原理是线粒体呼吸链复合体Ⅲ把还原型 CoQ 的氢传递给细胞色素 C，生成还原型细胞色素 C，与氧化型细胞色素 C 不同，还原型细胞色素 C 在 550 nm 有特征光吸收，因此 550 nm 光吸收增加速率能够反映线粒体呼吸链复合体Ⅲ活性，通过检测 550 nm 处吸光度的变化即可计算出样本中线粒体呼吸链复合体Ⅲ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	13 mL	26 mL	4℃
Reagent Ⅳ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存
Reagent Ⅴ	4 mL	4 mL	4℃，避光保存
Reagent Ⅵ	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。**

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

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	4℃保存。
Working Reagent Ⅳ	临用前配制；96T 用 2.4 mL Reagent Ⅲ充分溶解；48T 用 1.2 mL Reagent Ⅲ充分溶解	未用完的试剂分装后-20℃避光保存 1 个月，禁止反复冻融。
Reagent Ⅴ	即用型	4℃避光保存，**试剂易挥发，注意密封。**有刺激性气味，建议在通风橱使用。
Working Reagent Ⅵ	临用前配制；用 2.2 mL Reagent Ⅴ充分溶解（用涡旋混匀仪涡旋 3-5 min，确保充分溶解）。	**由于 Working Reagent Ⅵ易被氧化，请必须分装后保存。**分装后-20℃密封避光保存 1 个月。**每小支仅可使用一次，禁止二次开封。**使用时会有物质析出，需用涡旋混匀仪涡旋 3-5 min 使析出物充分溶解再使用。

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、KTB1881 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Ⅲ（此步可选做，可用于判断线粒体提取效果）。

5. 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 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**	不稀释
小鼠心脏组织	4-5	**小鼠肺脏组织**	1-2	**兔脑组织**	5-6	**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	8-12	**小鼠肌肉组织**	不稀释	**兔脾脏组织**	1-2	**植物组织**	不稀释

05-3 实验步骤

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 200 μL（Reagent Ⅲ **187.5 μL**：Working Reagent Ⅵ **12.5 μL**，配制体积比 **15：1**）配制工作液，上下颠倒混匀，避免剧烈震荡产生大量气泡影响使用。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 20 μL 样本、20 μL Working Reagent Ⅳ和 200 μL 工作液，**在 5 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。

4. **吸光度检测**：迅速混匀后读取 550 nm 处 0 min 时的吸光值 A_1，反应 5 min 后读取吸光值 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$\Delta A=A_2-A_1$，$\Delta A_{上清}=A_{2\,上清}-A_{1\,上清}$，$\Delta A_{沉淀}=A_{2\,沉淀}-A_{1\,沉淀}$。

2. 样本线粒体呼吸链复合体Ⅲ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生成 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Ⅲ活性(U/g)=[$\Delta A_{上清}$×$V_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷(W÷$V_{提取}$×$V_{样}$)÷T=**251×$\Delta A_{上清}$÷W**

沉淀中复合体Ⅲ活性(U/g)=[$\Delta A_{沉淀}$×$V_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷(W÷$V_{重悬}$×$V_{样}$)÷T=**50×$\Delta A_{沉淀}$÷W**

线粒体呼吸链复合体Ⅲ总活性(U/g)=**251×$\Delta A_{上清}$÷W+50×$\Delta A_{沉淀}$÷W**

- 按细胞数量计算:

单位的定义：每 10^4 个细胞每分钟生成 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Ⅲ活性(U/10^4)=[$\Delta A_{上清}$×$V_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷($V_{样}$÷$V_{提取}$×N)÷T=**251×$\Delta A_{上清}$÷N**

沉淀中复合体Ⅲ活性(U/10^4)=[$\Delta A_{沉淀}$×$V_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷($V_{样}$÷$V_{重悬}$×N)÷T=**50×$\Delta A_{沉淀}$÷N**

线粒体呼吸链复合体Ⅲ总活性(U/10^4)=**251×$\Delta A_{上清}$÷N+50×$\Delta A_{沉淀}$÷N**

$V_{反总}$：反应体系总体积，2.4×10^{-4} L；ε：还原型细胞色素 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，0.02 mL；T：反应时间，5 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，0.2 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 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$\Delta A_{上清}$=$A2_{上清}$-$A1_{上清}$=0.386-0.366=0.020，用 Reagent Ⅱ稀释 10 倍的$\Delta A_{沉淀}$=$A2_{沉淀}$-$A1_{沉淀}$=0.364-0.241=0.123，按样本质量计算得:上清中线粒体呼吸链复合体Ⅲ活性(U/g)=251×$\Delta A_{上清}$÷W=251×0.020÷0.1=50.2 U/g，稀释 10 倍的沉淀中线粒体呼吸链复合体Ⅲ活性(U/g)=50×$\Delta A_{沉淀}$÷W=50×0.123÷0.1=61.5 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，则说明样本中线粒体呼吸链复合体Ⅲ活性较高，需用 Reagent Ⅱ适当稀释，再重新进行测定。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Ⅲ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）
KTB1881	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅳ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III活性检测流程示意图

（Abbkine 货号 ： KTB1871）

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

200 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

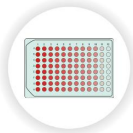
工作液的配制：按照每孔200 μL（Reagent III 187.5 μL：Working Reagent VI 12.5 μL，配制体积比15：1）配制工作液，上下颠倒混匀，避免剧烈震荡产生大量气泡影响使用。现用现配，密封避光保存。



样本	20 μL
Working Reagent IV	20 μL
工作液	200 μL

在5 min内完成全部加样操作不会影响检测结果

数据检测



迅速混匀后读取550 nm处0 min时的吸光值A1，反应5 min后读取吸光值A2

结果计算