CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅱ活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1861　　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Ⅱ（EC 1.3.5.1）又称琥珀酸-辅酶 Q 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。呼吸链复合体Ⅱ从 FADH 中获得电子，并将电子传递给氧化态泛醌 Q 生成还原态泛醌 QH2，整个过程没有发生质子的跨膜转运。呼吸链复合体Ⅱ的蛋白结构相对简单，由 4 个蛋白亚基组成。呼吸链复合体Ⅱ与呼吸链复合体Ⅰ、呼吸链复合体Ⅲ、呼吸链复合体Ⅳ的功能也不同，并不转运质子，可视为电子传递链的一个旁路。

本试剂盒检测原理是线粒体呼吸链复合体Ⅱ催化琥珀酸氧化生成延胡索酸，同时蓝色的 2,6-二氯吲哚酚（DCPIP）转化为无色，2,6-二氯吲哚酚在 600 nm 有特征吸收峰，通过检测 600 nm 处吸光度的降低速率即可计算出样本中线粒体呼吸链复合体Ⅱ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	12 mL	12 mL×2	-20℃,避光保存
Reagent Ⅳ	0.5 mL	1 mL	4℃,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 600 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；使用前平衡到室温。	-20℃避光保存。
Reagent Ⅳ	即用型	4℃避光保存。
工作液	临用前配制；按照每孔 201.5 μL（Reagent Ⅲ **195 μL**：Reagent Ⅳ **6.5 μL**，配制体积比 **30：1**）配制工作液，混合均匀。	工作液注意避光保存。未用完的试剂 4℃可保存 1 周，-20℃可保存 1 个月，避免反复冻融。

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、KTB1871、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Ⅱ（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**	2-6	**兔心脏组织**	1-2	**兔肺脏组织**	1-2
小鼠心脏组织	12-14	**小鼠肺脏组织**	2-6	**兔脑组织**	2-6	**兔肾脏组织**	10-14
小鼠脑组织	6-14	**小鼠肾脏组织**	10-14	**兔肝脏组织**	2-4	**兔肌肉组织**	不稀释
小鼠肝脏组织	10-14	**小鼠肌肉组织**	2-4	**兔脾脏组织**	4-6	**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 600 nm。

2. **检测体系配制**：96 孔板中依次加入 20 μL 样本和 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。

3. **吸光度检测**：迅速混匀后读取 600 nm 处 0 min 时的吸光值 A_1，置于 37℃避光孵育 5 min（酶标仪有温控功能的将温度调节至 37℃），读取 5 min 时的吸光值 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Ⅱ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消耗 1 nmol 2,6-二氯吲哚酚定义为一个酶活力单位。

上清中复合体Ⅱ活性(U/g)=$[\Delta A_{上清}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times 10^9]\div(W\div V_{提取}\times V_{样})\div T$**$=209.5\times\Delta A_{上清}\div W$**

沉淀中复合体Ⅱ活性(U/g)=$[\Delta A_{沉淀}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times 10^9]\div(W\div V_{重悬}\times V_{样})\div T$**$=41.9\times\Delta A_{沉淀}\div W$**

线粒体呼吸链复合体Ⅱ总活性(U/g)=**$209.5\times\Delta A_{上清}\div W+41.9\times\Delta A_{沉淀}\div W$**

- 按细胞数量计算:

单位的定义：每 10^4 个细胞每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯吲哚酚定义为一个酶活力单位。

上清中复合体Ⅱ活性(U/10^4)=[$\Delta A_{上清}$×$V_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷($V_{样}$÷$V_{提取}$×N)÷T=**209.5×$\Delta A_{上清}$÷N**

沉淀中复合体Ⅱ活性(U/10^4)=[$\Delta A_{沉淀}$×$V_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷($V_{样}$÷$V_{重悬}$×N)÷T=**41.9×$\Delta A_{沉淀}$÷N**

线粒体呼吸链复合体Ⅱ总活性(U/10^4)=**209.5×$\Delta A_{上清}$÷N+41.9×$\Delta A_{沉淀}$÷N**

$V_{反总}$：反应体系总体积，2.2×10^{-4} L；ε：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数，21×10^3 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 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$\Delta A_{上清}$=$A1_{上清}$-$A2_{上清}$=0.724-0.456=0.268，用 Reagent Ⅱ稀释 10 倍的$\Delta A_{沉淀}$=$A1_{沉淀}$-$A2_{沉淀}$=0.866-0.581=0.285，按样本质量计算得：上清中线粒体呼吸链复合体Ⅱ活性(U/g)=209.5×$\Delta A_{上清}$÷W=209.5×0.268÷0.1=561.460 U/g，稀释 10 倍的沉淀中线粒体呼吸链复合体Ⅱ活性(U/g)=41.9×$\Delta A_{沉淀}$÷W=41.9×0.285÷0.1=119.415 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>0.5，则说明样本中线粒体呼吸链复合体Ⅱ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Ⅱ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）
KTB1871	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅲ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 II 活性检测流程示意图

（Abbkine 货号 ： KTB1861）

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

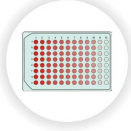
工作液的配制：按照每孔201.5 μL（Reagent III 195 μL：Reagent IV 6.5 μL，配制体积比30：1）配制工作液，混合均匀。



样本	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600 nm处0 min时的吸光值A1，置于37℃避光孵育5 min（酶标仪有温控功能的将温度调节至37℃），读取5 min时的吸光值A2

结果计算

V1.0