# (本试剂盒仅供体外研究使用,不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K838-M

产品规格: 48T(46 samples)/96T(94 samples)

检测仪器: 酶标仪(340 nm)

# Elabscience<sup>®</sup>细胞线粒体呼吸链复合物V (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 酶/ATP 合成酶) 比色法测试盒 Cell Mitochondrial Complex V

(F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase/ATP Synthase) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题,请通过以下方式联系我们:

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。 联系时请提供产品批号(见试剂盒标签),以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测细胞样本中线粒体呼吸链复合物V的酶活。

## 检测原理

线粒体复合物 V 又称为  $F_0F_1$ -ATP 合成酶,ATP 被  $F_0F_1$ -ATP 合成酶水解后生成 ADP,ADP 在酶转化反应后,使还原型辅酶I(NADH)转化为氧化型辅酶I(NAD),通过检测 340 nm 处吸光度的变化速率,来计算  $F_0F_1$ -ATP 酶活。

本试剂盒检测细胞样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

## 提供试剂和物品

| 编号          | 名称                    | 规格1             | 规格 2           | 保存方式      |
|-------------|-----------------------|-----------------|----------------|-----------|
|             |                       | (Size 1)(48 T)  | (Size 2)(96 T) | (Storage) |
| 试剂一         | 提取液                   | 25 mL×1 瓶       | 50 mL×1 瓶      | -20°C     |
| (Reagent 1) | (Extraction Solution) |                 |                | 保存6个月     |
| 试剂二         | 蛋白酶抑制剂                | 0.8 mL×1 支      | 0.8 mL×2 支     | -20°C 避光  |
| (Reagent 2) | (Protease Inhibitor)  | 0.6 IIIL^1 文    |                | 保存6个月     |
| 试剂三         | 缓冲液                   | <br>  15 mL×1 瓶 | 30 mL×1 瓶      | -20°C     |
| (Reagent 3) | (Buffer Solution)     | 13 IIIL^1 74    |                | 保存6个月     |
| 试剂四         | 底物 A                  | 液体×1 支          | 液体×2 支         | -20°C 避光  |
| (Reagent 4) | (Substrate A)         |                 |                | 保存6个月     |
| 试剂五         | 底物 B                  | .b\ →11 +       | 粉剂×2 支         | -20°C 避光  |
| (Reagent 5  | (Substrate B)         | 粉剂×1 支          |                | 保存6个月     |
| 试剂六         | 底物 C                  | .bbl., 1 -b     | 粉剂×2 支         | -20°C 避光  |
| (Reagent 6) | (Substrate C)         | 粉剂×1 支          |                | 保存6个月     |
| 试剂七         | 底物 D                  | 粉剂×2 支          | 粉剂×4 支         | -20°C 避光  |
| (Reagent 7) | (Substrate D)         |                 |                | 保存6个月     |
|             | 96 孔紫外酶标板             | 96 孔            | ×1 块           | 无要求       |
|             | 96 孔覆膜                | 2               | 张              |           |
|             | 样本位置标记表               | 1               | 张              |           |

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存,不同测试盒中的试剂不能混用。 对于体积较少的试剂,使用前请先离心,以免量取不到足够量的试剂。

# 所需自备物品

仪器: 酶标仪(330-350 nm, 最佳检测波长 340 nm)

# 试剂准备

- ① 检测前, 试剂盒中的试剂平衡至室温。
- ② 试剂五工作液的配制: 取一支试剂五加入300 μL双蒸水溶解,可分装-20°C避光保存7天。
- ③ 试剂六工作液的配制: 取一支试剂六加入300 μL双蒸水溶解,可分装-20°C避光保存7天。
- ④ 反应工作液的配制: 按体积比试剂三: 试剂四: 试剂五工作液: 试剂六工作液=100: 1: 2: 2, 2-8°C可避光保存8 h。
- ⑤ 酶工作液的配制: 取一支试剂七用0.6 mL双蒸水混匀溶解,按需配制,可分装2-8°C避光保存3天。

# 样本准备

#### ① 样本处理

细胞样本:收集 $1\times10^6$ 细胞样本加入 $0.2\,\text{mL}$ 试剂一和 $4\,\mu\text{L}$ 试剂二,振荡混匀,超声破碎(冰浴,功率 $200\,\text{W}$ ,超声 $5\,\text{s}$ ,间隔 $10\,\text{s}$ ,重复15次), $10000\times$ g低温离心 $3\,\text{min}$ ,弃沉淀取上清待测,留取部分上清用于蛋白浓度测定。

#### ② 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稀释成不同浓度进行预实验,根据预实验的结果,结合本试剂盒的线性范围: 3.40-272.07 U/L,请参考下表稀释(仅供参考):

| 样本              | 稀释倍数 | 样本               | 稀释倍数 |
|-----------------|------|------------------|------|
| 1×10^6 HL-60 细胞 | 不稀释  | 4×10^6 CHO 细胞    | 不稀释  |
| 1×10^6 Hela 细胞  | 不稀释  | 1×10^6 Jurkat 细胞 | 不稀释  |

注: 样本稀释液为试剂一。

## 实验关键点

- ① 试剂准备时,需确保配制后的反应工作液中粉剂完全溶解。
- ② 加入反应工作液后要在 10 s 内开始测定。
- ③ 样本测定时,测定孔初始 OD 值低于 0.7 或者测定孔 4 min 的变化 OD 值超过 0.3,均需要对样本进行稀释。

# 操作步骤

- ① 空白孔: 取 20 µL 试剂一加入到空白孔中 测定孔: 取 20 µL 待测样本加入到测定孔中。
- ② 向步骤①各孔加入 20 μL 酶工作液。
- ③ 向步骤②各孔中加入180 µL 反应工作液。
- ④ 酶标仪于 340 nm 处测定各孔的 OD 值 A<sub>1</sub>, 4 min 后, 测定各孔的 OD 值 A<sub>2</sub>。 (建议按照下方的注解进行测定)

注:测定孔测定酶活:加入反应工作液后,建议每分钟记录一次 OD 值, 共记录 4 min,观察其 4 min 内的 OD 值变化是否为匀速下降,否则样本 需要进行稀释,计算时,取初始 OD 值  $A_1$ , 4 min 测得 OD 值  $A_2$ 。

# 操作表

|                             | 空白孔 | 测定孔 |
|-----------------------------|-----|-----|
| 试剂一(μL)                     | 20  |     |
| 待测样本(μL)                    |     | 20  |
| 酶工作液(μL)                    | 20  | 20  |
| 反应工作液(μL)                   | 180 | 180 |
| 転上以工 240 协测户夕 3 46 OD 体 A 4 |     |     |

酶标仪于 340 nm 处测定各孔的 OD 值  $A_1$ , 4 min 后, 测定各孔的 OD 值  $A_2$ 。

本试剂盒检测细胞样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

## 结果计算

### 细胞样本线粒体呼吸链复合物 V 酶活计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每克样本蛋白每分钟催化分解 1 μmol NADH 所需要的酶量为一个酶活单位。

线粒体复合物 V 酶活 
$$\frac{\Delta A_{\parallel} - \Delta A_{\underline{c}}}{6220 \times 0.65} \times 0.22 \div t \div 0.02 \div C_{pr} \times f \times 10^{6}$$

#### 注解:

AA<sub>测</sub>: 测定孔变化 OD 值, A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>

ΔA x: 空白孔变化 OD 值, A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>

6220: NADH 摩尔消光系数, L/(mol•cm)

0.65: 光径, cm

0.22: 总反应体积, mL

0.02: 加样体积, mL

t: 反应时间, 4 min

f: 样本稀释倍数

Cpr: 样本蛋白浓度, gprot/L

 $10^6$ : 1 mol =  $10^6$  µmol

## 附录1 关键数据

## 1. 技术参数

| 检测范围 | 3.40-272.07 U/L | 批间差 | 3.0-6.5 % |
|------|-----------------|-----|-----------|
| 灵敏度  | 3.40 U/L        | 批内差 | 3.0-4.0 % |
| 回收率  | 101-105 %       |     |           |

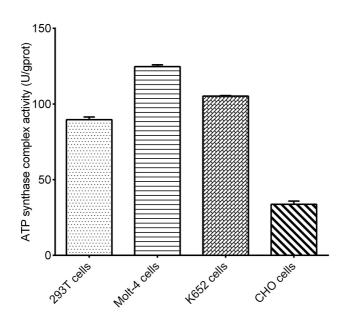
# 附录2 实例分析

#### 例如检测293 T细胞(数据仅供参考):

制备的293 T细胞上清的样本20  $\mu$ L, 按操作表操作, 结果如下: 测定孔 初始OD值A<sub>1</sub>为0.752, 反应4 min后测定OD值A<sub>2</sub>为0.621,  $\Delta$ A<sub>测</sub> = 0.752 - 0.621 = 0.131; 空白孔初始OD值A<sub>1</sub>为0.634, 反应4 min后OD值A<sub>2</sub>为0.630,  $\Delta$ A空白 = A<sub>1</sub>- A<sub>2</sub> = 0.634 - 0.630 = 0.004, 293 T细胞蛋白浓度为1.044 gprot/L, 计算结果为:

线粒体复合物 V 总酶活 = 
$$\frac{0.131 - 0.004}{6220 \times 0.65} \times 0.22 \div 4 \div 0.02 \div 1.044 \times 10^6 = 82.743$$
 U/gprot

接说明书操作,测定293 T细胞( $1\times10^{6}$ 个,蛋白浓度为1.004 gprot/L,加样量 $20~\mu$ L)、Molt-4细胞( $1\times10^{6}$ 个,蛋白浓度为0.627 gprot/L,加样量 $20~\mu$ L)、K652细胞 ( $1\times10^{6}$ 个,蛋白浓度为1.300 gprot/L,加样量 $20~\mu$ L)、CHO( $4\times10^{6}$ 个,蛋白浓度为5.510 gprot/L,加样量 $20~\mu$ L)中线粒体复合物V活力(如下图):



# 附录3 问题答疑

| 问题     | 可能原因      | 建议解决方案              |  |
|--------|-----------|---------------------|--|
| 样本测不出值 | 样本浓度低或者稀释 | 增加上样量或重新匀浆提高匀浆浓度    |  |
|        | 倍数较大      | 177 工作主义主动为永秋尚为永秋及  |  |
|        | 样本匀浆液放置时间 | 重新处理样本              |  |
|        | 过长        |                     |  |
|        | 反应工作液失效   | 建议试剂用完后避光 2-8℃ 保存。试 |  |
|        | 及应工作权大效   | 剂配制后尽量在8h内完成测定实验    |  |

#### 声明

- 1. 试剂盒仅供研究使用,如将其用于临床诊断或任何其他用途,我公司将 不对因此产生的问题负责,亦不承担任何法律责任。
- 2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器,严格按照说明书进行实验。
- 3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
- 4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物 浓度过高或过低,请对样本做适当的稀释或浓缩。
- 5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中,建议先做预实验验证其检测 有效性。
- 6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责,不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责,使用前请充分考虑样本可能的使用量,预留充足的样本。