

(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[®]细胞线粒体呼吸链复合物V
(F₀F₁-ATP 酶/ATP 合成酶) 比色法测试盒
Cell Mitochondrial Complex V
(F₀F₁-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 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	蛋白酶抑制剂 (Protease Inhibitor)	0.8 mL×1 支	0.8 mL×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	缓冲液 (Buffer Solution)	15 mL×1 瓶	30 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 A (Substrate A)	液体×1 支	液体×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	底物 B (Substrate B)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	底物 C (Substrate C)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	底物 D (Substrate D)	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔紫外酶标板	1 板		
	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 μ L双蒸水溶解，可分装-20 $^{\circ}$ 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 μ L双蒸水溶解，可分装-20 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C避光保存3天。

样本准备

① 样本处理

细胞样本：收集 1×10^6 细胞样本加入0.2 mL试剂一和4 μ L试剂二，振荡混匀，超声破碎(冰浴，功率200 W，超声5 s，间隔10 s，重复15次)， $10000 \times g$ 低温离心3 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_1 ，4 min 后，测定各孔的 OD 值 A_2 。（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
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℃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。

$$\text{线粒体复合物 V 酶活 (U/gprot)} = \frac{\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}}{6220 \times 0.65} \times 0.22 \div t \div 0.02 \div C_{\text{pr}} \times f \times 10^6$$

注解：

$\Delta A_{\text{测}}$ ：测定孔变化 OD 值， $A_1 - A_2$

$\Delta A_{\text{空}}$ ：空白孔变化 OD 值， $A_1 - A_2$

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

C_{pr} ：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 %		

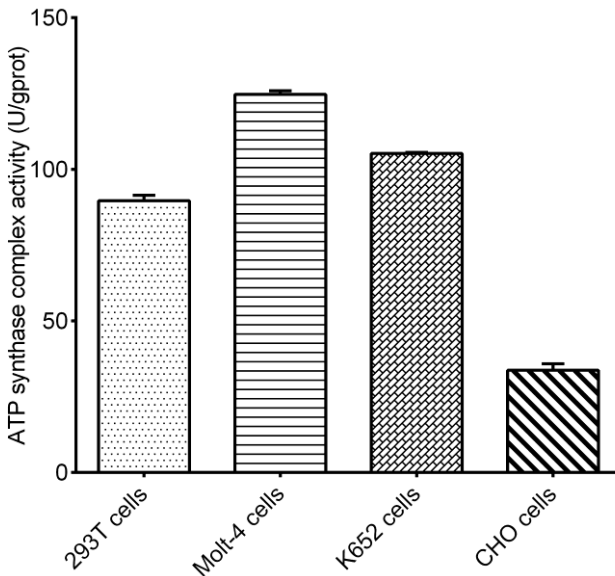
附录2 实例分析

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 μL , 按操作表操作, 结果如下: 测定孔初始OD值 A_1 为0.752, 反应4 min后测定OD值 A_2 为0.621, $\Delta A_{\text{测}} = 0.752 - 0.621 = 0.131$; 空白孔初始OD值 A_1 为0.634, 反应4 min后OD值 A_2 为0.630, $\Delta A_{\text{空白}} = A_1 - A_2 = 0.634 - 0.630 = 0.004$, 293 T细胞蛋白浓度为1.044 gprot/L, 计算结果为:

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

按说明书操作, 测定293 T细胞(1×10^6 个, 蛋白浓度为1.004 gprot/L, 加样量20 μL)、Molt-4细胞(1×10^6 个, 蛋白浓度为0.627 gprot/L, 加样量20 μL)、K652细胞 (1×10^6 个, 蛋白浓度为1.300 gprot/L, 加样量20 μL)、CHO(4×10^6 个, 蛋白浓度为5.510 gprot/L, 加样量20 μL)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倍数较大	增加上样量或重新匀浆提高匀浆浓度
	样本匀浆液放置时间过长	重新处理样本
	反应工作液失效	建议试剂用完后避光 2-8℃ 保存。试剂配制后尽量在 8 h 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。