（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-K153-M

产品规格：48T(24 samples)/96T(48 samples)

检测仪器：酶标仪(340 nm)

Elabscience®线粒体呼吸链复合物V

（F_0F_1-ATP 酶/ATP 合成酶）比色法测试盒

Mitochondrial Complex V

(F_0F_1-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动物组织、细胞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。

本试剂盒检测组织、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 A (Extraction Solution A)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	提取液 B (Extraction Solution B)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	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
试剂四 (Reagent 4)	缓冲液 (Buffer Solution)	15 mL×1 瓶	30 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	底物 A (Substrate A)	液体×1 支	液体×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	底物 B (Substrate B)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	底物 C (Substrate C)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	底物 D (Substrate D)	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂九 (Reagent 9)	抑制剂 (Inhibitor)	0.05 mL×1 支	0.1 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔 UV 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 ℃避光保存7天。

③ 试剂七工作液的配制：

取一支试剂七加入300 μL双蒸水溶解，可分装-20 ℃避光保存7天。

④ 反应工作液的配制：

按体积比试剂四：试剂五：试剂六工作液：试剂七工作液=100：1：2：2，2-8 ℃可避光保存8 h。

⑤ 酶工作液的配制：

取一支试剂八用0.6 mL双蒸水混匀溶解，按需配制，2-8 ℃可避光保存3天。

⑥ 特异性工作液的配制：

取试剂九：双蒸水按体积比=1：100混匀，现配现用，按需配制，避光待用，剩余试剂九可分装-20 ℃保存1周。

样本准备

样本处理

组织样本：

① 取0.1 g组织样本加入0.9 mL试剂一匀浆，600 ×g，4 ℃离心5 min，取上清弃沉淀。

② 上清液15000 ×g，4 ℃离心10 min，弃上清取沉淀。

③ 沉淀加入200 μL试剂二与10 μL试剂三混匀，超声5 min。 15000 ×g，4 ℃离心10 min，弃沉淀取上清待测。留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：

① 取5×10^6个细胞，加入0.9 mL试剂一匀浆，600 ×g，4 ℃离心5 min，取上清弃沉淀。

② 上清液15000 ×g，4 ℃离心10 min，弃上清取沉淀。

③ 沉淀加入200 μL试剂二与10 μL试剂三混匀，超声5 min。 15000 ×g，4 ℃离心10 min，取上清待用，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

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：3.55-74.21 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
10%小鼠肝组织	2-6	10%大鼠肝组织	1-4
10%小鼠肾组织	2-6	5×10^6 个 HL-60 细胞	1-2
10%大鼠肌肉组织	1-3	5×10^6 个 Jurkat 细胞	1-2

注：样本稀释液为试剂二。

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，测定孔与对照孔初始 OD 值低于 0.7 或者测定孔与对照孔 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 对照孔：取 10 μL 特异性工作液加入相应对照孔中，
测定孔：取 10 μL 双蒸水加入相应测定孔中。

② 向步骤①中各孔加入 20 μL 待测样本。

③ 混匀，振板 3 s，37 ℃ 下孵育 4 min。。

④ 向步骤③各孔加入 20 μL 酶工作液。

⑤ 向步骤④各孔中加入 180 μL 反应工作液。

⑥ 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：测定孔测定总酶活，对照孔测定非特异性酶活；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

	对照孔	测定孔
特异性工作液(μL)	10	--
双蒸水(μL)	--	10
待测样本(μL)	20	20
振板 3 s，37 ℃ 下孵育 4 min。		
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。(建议按照操作步骤下方注解的方式进行测定)		

本试剂盒检测组织与细胞样本时，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

组织与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，每克线粒体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。

$$\text{线粒体复合物 V 酶活 (U/gprot)} = \frac{(\Delta A_{测} - \Delta A_{对})}{6220 \times 0.65} \times 0.23 \div t \div 0.02 \div C_{pr} \times f \times 10^6$$

注解：

$\Delta A_{测}$：测定孔变化 OD 值，A_1-A_2

$\Delta A_{对}$：对照孔变化 OD 值，A_1-A_2

6220：NADH 摩尔消光系数，L/(mol•cm)

0.65：光径，cm

0.23：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}：样本线粒体蛋白浓度，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	3.55-74.21 U/L	**平均批间差**	6.5 %
灵敏度	3.55 U/L	**平均批内差**	5.6 %
平均回收率	101 %		

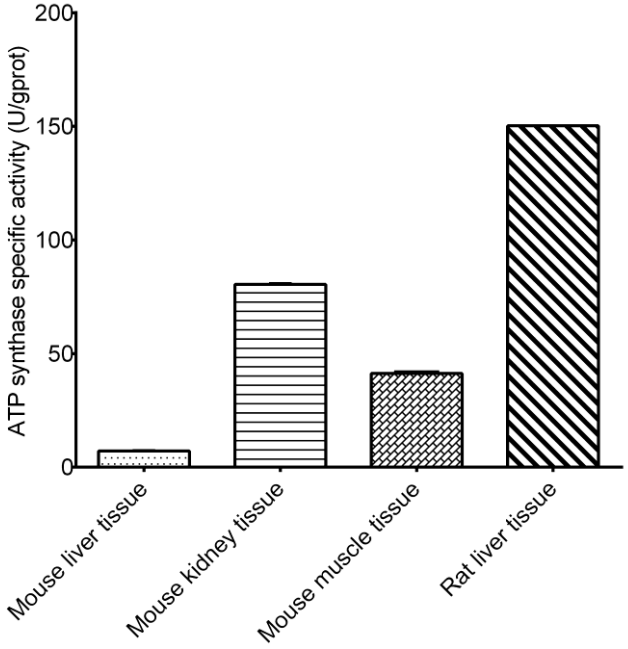
附录2 实例分析

例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考)：

制备的10%小鼠肝组织匀浆线粒体上清用试剂二稀释4倍，取稀释后的样本20 μL，按操作表操作，结果如下：测定孔初始OD值A_1为0.900，反应4 min后测定OD值A_2为0.426，$\Delta A_{测} = 0.900 - 0.426 = 0.474$。对照孔初始OD值$A_1$为0.914，反应4 min后测定OD值$A_2$为0.471，$\Delta A_{对} = 0.914 - 0.471 = 0.443$。10%小鼠肝组织匀浆线粒体蛋白浓度为12.14 gprot/L，计算结果为：

$$\underset{(\mathrm{U/gprot})}{\text{线粒体复合物 V 酶活}} = \frac{0.474 - 0.443}{6220 \times 0.65} \times 0.23 \div 4 \div 0.02 \div 12.14 \times 4 \times 10^6 = 7.26\ \mathrm{U/gprot}$$

按说明书操作，测定小鼠肝组织(10%线粒体蛋白浓度为12.14 gprot/L，稀释4倍，加样量20 μL)、小鼠肾组织(10%线粒体蛋白浓度为12.33 gprot/L，稀释4倍，加样量20 μL)、小鼠肌肉组织(10%线粒体蛋白浓度为1.86 gprot/L，稀释4倍，加样量20 μL)、大鼠肝组织(10%线粒体蛋白浓度为7.50 gprot/L，稀释4倍，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 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。