

线粒体复合体V试剂盒说明书

(货号: ADS-F-X011-24 分光法 24 样)

一、产品简介:

线粒体呼吸链复合体 V, 通常称为 ATP 合成酶 (ATP synthase)、F 型 ATP 酶 (F type ATPase) 和 F1F0ATP 酶 (F1F0ATPase), 是线粒体氧化磷酸化的终极反应。复合物 V 的主要功能在于产生大部分细胞所需要的能量 ATP。在动物中该酶异常会导致心肌和神经系统疾病。

线粒体呼吸链复合体 V (F1F0ATP 酶) 催化 ADP 和 Pi 反应生成 ATP, 通过己糖激酶和磷酸葡萄糖脱氢酶的相继作用, 伴随着 NADP⁺还原成 NADPH, 通过检测 340nm 处 NADPH 的增加速率即可得出线粒体复合体 V 合成 ATP 的酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 30mL×1 瓶	-20℃ 保存	
试剂二	液体 5mL×1 瓶	-20℃ 保存	
试剂三	液体 1 支	-20℃ 保存	
试剂四	粉剂 1 支	4℃ 保存;	前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.8mL 蒸馏水溶解备用。
试剂五	粉剂 1 支	-20℃ 保存	前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.8mL 蒸馏水溶解备用。
试剂六	粉剂 1 支	-20℃ 保存	前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.7mL 蒸馏水溶解备用。
试剂七	液体 27mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂八	粉剂 1 支	4℃ 保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、低温台式离心机、研钵、冰和蒸馏水。

四、线粒体复合体 V 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、线粒体制备 (提示: 整个线粒体的提取过程须保持 4℃低温环境):

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌/细胞, 加入 1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于 4℃×700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4℃×12000g 离心 10min。沉淀即为提取的线粒体, 用作第④步操作。
- ③ (选做) 上步得到的上清液即为胞浆提取物, 可作为样本用于测定从线粒体泄漏的线粒体呼吸链复合体 V, 用于判断线粒体提取效果。
- ④ 在沉淀 (线粒体) 中加入 200μL 试剂二和 2μL 试剂三, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 液体置于冰上用于线粒体复合体 V 酶活性测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取, 或按照细菌/细胞数量 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

- ② 将下表体系用到的所有试剂置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）于恒温振荡培养箱或水浴锅中孵育 15min；在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	60	60
试剂四	30	30
试剂五	30	30
试剂六	30	30
试剂七	520	520
混匀，置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）下孵育 10min		
试剂八	30	
试剂七		30
混匀，立即于 340nm 处读取各管 A1，置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种），15min 后读取 A2， $\Delta A = (A2 - A1)$ 测定 - $(A2 - A1)$ 对照（每个样本做一个自身对照）。		

【注】若 ΔA 的值在零附近徘徊，可以增加样本加样体积（如 100μL，试剂七相应减少），或延长反应时间（如增至 10min），则改变后的加样体积 V1 或反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

$$\text{复合体 V 活性 (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ = 125.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

$$\text{复合体 V 活性 (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 25.3 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

$$\text{复合体 V 活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ = 0.05 \times \Delta A$$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d---光径，1cm；

V---加入提取液体积，0.202mL V1---加入样本体积，0.06mL；

V2---反应体系总体积， 7×10^{-4} L； T---反应时间，15min；

W---样本质量，g； 500---细胞或细菌总数，500 万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL； 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。