

## 线粒体复合体V试剂盒说明书

(货号: ADS-W-X011-48 微板法 48 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<sup>+</sup>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 60mL×1 瓶 | -20℃保存 |                                    |
| 试剂二  | 液体 10mL×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 1.1mL 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 1.1mL 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 1.1mL 蒸馏水溶解备用。  |
| 试剂七  | 液体 18mL×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:

酶标仪、96 孔板、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 (10<sup>4</sup>): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

#### 2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

- 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；
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

| 试剂名称（μL）                                                                                                                  | 测定管 | 对照管 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 样本                                                                                                                        | 20  | 20  |
| 试剂四                                                                                                                       | 10  | 10  |
| 试剂五                                                                                                                       | 10  | 10  |
| 试剂六                                                                                                                       | 10  | 10  |
| 试剂七                                                                                                                       | 140 | 140 |
| 混匀，置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）下孵育 10min                                                                                     |     |     |
| 试剂八                                                                                                                       | 10  |     |
| 试剂七                                                                                                                       |     | 10  |
| 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，<br>$\Delta A = (A2 - A1)$ 测定 - $(A2 - A1)$ 对照（每个样本做一个自身对照）。 |     |     |

【注】若  $\Delta A$  的值在零附近徘徊，可以增加样本加样体积（如 40μL，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。

$$\begin{aligned} \text{复合体V活性 (nmol/min /mg prot)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 214.4 \times \Delta A \div Cpr \end{aligned}$$

### 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。

$$\begin{aligned} \text{复合体V活性 (nmol/min /g 鲜重)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 43.4 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

### 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。

$$\begin{aligned} \text{复合体V活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.087 \times \Delta A \end{aligned}$$

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L/mol/cm； d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，0.202 mL V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  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。