

线粒体复合体 V/ATP 合成酶(合成作用)试剂盒说明书

(货号: ADS-W-X013-48 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	-20℃ 保存	
试剂三	液体 1 支	-20℃ 避光保存	
试剂四	粉剂 1 支	-20℃ 避光保存	1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉剂 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂六	粉剂 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂七	液体 18mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂八	粉剂 1 支	4℃ 保存	1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

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、检测步骤：

- 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℃（哺乳动物）或 25℃（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：

试剂组分（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℃（哺乳动物）或 25℃（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℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种），15min 后读取 A2， ΔA = (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 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。

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

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 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, 2×10^{-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。