

线粒体复合体 V 检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-X011-100 微板法 48 样)

有效期: 3 个月

测定意义:

线粒体复合体 V 又称 F_1F_0 -ATP 合酶, 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体中, 由 F_1 和 F_0 两个亚单位组成。该酶利用呼吸链产生的质子电化学梯度催化 ATP 合成, 也可逆过程水解 ATP。此外, 复合体 V 还存在于叶绿体、异养菌和光合细菌中。复合体 V 是线粒体氧化磷酸化和叶绿体光合磷酸化合成 ATP 的关键酶。

测定原理:

复合体 V 水解 ATP 产生 ADP 和 P_i , 通过测定 P_i 增加速率来测定复合体 V 活性。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

试剂一: 液体 100mL×1 瓶, -20℃ 保存;

试剂二: 液体 80mL×1 瓶, -20℃ 保存;

试剂三: 液体 2 mL×1 瓶, -20℃ 保存;

试剂四: 粉剂×1 支, -20℃ 保存; 临用前每支加入 2mL 双蒸水, 充分溶解备用, 用不完的试剂仍-20℃ 保存;

试剂五: 液体 8mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂六: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 4mL 双蒸水, 充分混匀;

试剂七: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 10mL 双蒸水, 充分混匀;

试剂八: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 10mL 双蒸水, 充分混匀;

试剂九: 硫酸, 自备。取蒸馏水 8.7ml, 缓慢加入 1.4ml 硫酸, 混匀。

定磷试剂的配制: 按 H_2O : 试剂七: 试剂八: 试剂九=2:1:1:1 的比例配制, 配好的定磷试剂应为浅黄色。若无色则试剂失效, 若是蓝色则为磷污染 (请根据需要, 用多少配多少)。

注意: 配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器, 或者一次性塑料器皿, 以避免磷污染。

复合体 V 的提取:

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞、细菌, 加入 1.0 mL 试剂一和 10uL 试剂三, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- ② 4℃ 600 g 离心 5min。
- ③ 将上清液移至另一离心管中, 4℃ 11000 g 离心 10min。
- ④ 上清液即胞浆提取物, 可用于测定从线粒体泄漏的复合体 V (此步可选做, 可以判断线粒体提取效果)。
- ⑤ 在沉淀中加入 800uL 试剂二和 8uL 试剂三, 超声波破碎 (功率 20%, 超声 3 秒, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于复合体 V 酶活性测定, 并且用于蛋白含量测定。

测定步骤:

1、酶促反应（在 EP 管中加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
试剂四	20	20
试剂五	80	80
样品		100

混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 准确水浴 30min

试剂六	40	40
样品	100	

混匀, 4000g, 室温离心 10min, 取上清液

2、定磷(在 EP 管中加入下列试剂)

上清液	40	40
定磷试剂	210	210

混匀, 室温静置 10min 后, 取 200uL 至微量石英比色皿或 96 孔板中, 在 660nm 处读取 A 测定管和 A 对照管, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

复合体 V 活性计算:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

标准条件下测定的回归方程为 $y = 1.2487x + 0.0361$; x 为标准品浓度 (mmol/L), y 为 A 值。

1、组织中复合体 V 活性的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (U/mg prot)} &= [(A - 0.0361) \div 1.2487 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 64 \times (A - 0.0361) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (U/g 鲜重)} &= [(A - 0.0361) \div 1.2487 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 51.8 \times (A - 0.0361) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} &= [(A - 0.0361) \div 1.2487 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T \\ &= 0.104 \times (A - 0.0361) \end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 2.4×10^{-4} L; V 样: 加入样本体积, 0.1 mL; V 样总: 加入提取液体积, 0.808 mL; T: 反应时间, 30 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下:

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.624x + 0.0361$; x 为标准品浓度 (mmol/L), y 为 A 值。

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (U/mg prot)} &= [(A - 0.0361) \div 0.624 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 128 \times (A - 0.0361) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\text{复合体 V 活性 (U/g 鲜重)} = [(A - 0.0361) \div 0.624 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$$

$$=103.6 \times (A-0.0361) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} &= [(A-0.0361) \div 0.624 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T \\ &= 0.207 \times (A-0.0361) \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积， 2.4×10^{-4} L； V 样：加入样本体积，0.1 mL； V 样总：加入提取液体积，0.808 mL； T：反应时间，30 min； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样品质量，g； 500：细胞或细菌总数，500 万。

