

线粒体复合体V试剂盒说明书

分光光度法 25 管/12 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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 F1 和 F0 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 Pi，通过测定 Pi 增加速率来测定复合体V活性。

试剂的组成和配制

| 产品名称 | OP016-25T/12S | Storage |
|--------|---------------|---------|
| 试剂一：液体 | 25ml | -20°C |
| 试剂二：液体 | 25ml | -20°C |
| 试剂三：液体 | 1ml | -20°C |
| 试剂四：粉剂 | 1 支 | -20°C |
| 试剂五：液体 | 6ml | 4°C |
| 试剂六：粉剂 | 1 瓶 | 4°C |
| 试剂七：粉剂 | 1 瓶 | 4°C |
| 试剂八：粉剂 | 1 瓶 | 4°C |
| 试剂九：液体 | 10ml | 室温 |
| 说明书 | 一份 | |

试剂四：粉剂×1 支，-20°C保存；临用前每支加入 1.3mL 蒸馏水，充分溶解备用，用不完的试剂仍-20°C保存；

试剂六：粉剂×1 瓶，4°C保存；临用前加入 3mL 蒸馏水，充分混匀；溶解后 4°C保存一周；

试剂七：粉剂×1 瓶，4°C保存；临用前加入 10mL 蒸馏水，充分混匀；溶解后 4°C保存一周；

试剂八：粉剂×1 瓶，4°C保存；临用前加入 10mL 蒸馏水，充分混匀；溶解后 4°C保存一周；

定磷试剂的配制：按 H₂O: 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。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



需自备的仪器和用品

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

1、准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细菌或细胞，加入 1mL 试剂一和 10uL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。

2、将匀浆 600g，4℃离心 5min。

3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心 10min。

4、上清液即为除去线粒体的胞浆蛋白，可用于测定从线粒体泄漏的复合体V（此步可选做）。

5、步骤 4 中的沉淀即为线粒体，加入 800uL 试剂二和 8uL 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），用于复合体V酶活性测定。

测定步骤：

1、酶促反应

| 试剂名称 (μl) | 对照管 | 测定管 |
|-----------|-----|-----|
| 试剂四 | 25 | 25 |
| 试剂五 | 100 | 100 |
| 样本 | | 125 |

混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确水浴 30min

| | | |
|-----|-----|----|
| 试剂六 | 50 | 50 |
| 样本 | 125 | |

混匀，4000g，25℃离心 10min，取上清液

2、定磷

| | | |
|------|-----|-----|
| 上清液 | 170 | 170 |
| 定磷试剂 | 830 | 830 |

混匀，室温静置 10min 左右，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

标准条件下测定的回归方程为 $y = 1.274x + 0.004$ ；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。

$$\begin{aligned} \text{复合体V活性 (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.004) \div 1.274 \times V_{\text{反总}} \times 106] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 62.8 \times (\Delta A - 0.004) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(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。



复合体V活性 (nmol/min /g 鲜重) $= [(\Delta A - 0.004) \div 1.274 \times V_{\text{反总}} \times 106] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 50.7 \times (\Delta A - 0.004) \div W$

(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。

复合体V活性 (nmol/min /104 cell) $= [(\Delta A - 0.004) \div 1.274 \times V_{\text{反总}} \times 106] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.101 \times (\Delta A - 0.004)$

V 反总：反应体系总体积， 3×10^{-4} L； V 样：加入样本体积，0.125 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：样本质量，g； 500：细胞或细菌总数，500 万。

