# 线粒体复合体V试剂盒说明书

**微量法 100 管/48 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 | OP017-100T/48S | Storage |
|---|---|---|
| 试剂一：液体 | 100ml | -20℃ |
| 试剂二：液体 | 80ml | -20℃ |
| 试剂三：液体 | 2ml | -20℃ |
| 试剂四：粉剂 | 1 支 | -20℃ |
| 试剂五：液体 | 8ml | 4℃ |
| 试剂六：粉剂 | 1 瓶 | 4℃ |
| 试剂七：粉剂 | 1 瓶 | 4℃ |
| 试剂八：粉剂 | 1 瓶 | 4℃ |
| 试剂九：液体 | 10ml | 室温 |
| 说明书 | 一份 | |

试剂四：粉剂×1 支，-20℃保存；临用前加入 2mL 蒸馏水，充分溶解备用，用不完的试剂仍-20℃保存；
试剂六：粉剂×1 瓶，4℃保存；临用前加入 4mL 蒸馏水，充分混匀；溶解后 4℃保存一周；
试剂七：粉剂×1 瓶，4℃保存；临用前加入 10mL 蒸馏水，充分混匀；溶解后 4℃保存一周；
试剂八：粉剂×1 瓶，4℃保存；临用前加入 10mL 蒸馏水，充分混匀；溶解后 4℃保存一周；
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）。

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

**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。

## 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。

## 样本的前处理：

1、准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细胞，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（在 EP 管中加入下列试剂）

| 试剂名称（μl） | 对照管 | 测定管 |
|---|---|---|
| 试剂四 | 10 | 10 |
| 试剂五 | 40 | 40 |
| 样本 | | 50 |
| 混匀， 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确水浴 30min | | |
| 试剂六 | 20 | 20 |
| 样本 | 50 | |

混匀，4000g，25℃离心 10min，取上清液

混匀，570nm 下比色，读取对照吸光值 A1 和测定管吸光值 A2，计算△A=A2-A1。

2、定磷(在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂)

| | | |
|---|---|---|
| 上清液 | 30 | 30 |
| 定磷试剂 | 170 | 170 |

混匀，室温静置 10min 后，在 660nm 处读取 A 测定管和 A 对照管，计算ΔA=A 测定管-A 对照管。每个测定管设一个对照管。

5、由于每一个测定管需要设一个对照管，本试剂盒 50 管保证测 24 个 $NADP^+$或 NADPH。

## 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 = 1.274x + 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。复合体V活性（nmol/min/mg prot）=[(ΔA-0.004) ÷1.274×V 反总×106]÷(V 样×Cpr) ÷T =62.8× (ΔA-0.004) ÷Cpr

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

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）=[(ΔA-0.004) ÷1.274×V 反总×106]÷(W× V 样÷V 样总) ÷T =50.7×(ΔA-0.004) ÷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）=[(ΔA-0.004) ÷1.274×V 反总×106]÷(500×V 样÷V 样总) ÷T=0.101×(ΔA-0.004)

V 反总：反应体系总体积，1.2×10-4 L； V 样：加入样本体积，0.05 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。

**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 = 0.637x + 0.004；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。

复合体V活性（nmol/min /mg prot）=[(ΔA-0.004) ÷0.637×V 反总×106]÷(V 样×Cpr) ÷T
=125.6× (ΔA-0.004) ÷Cpr

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）=[(ΔA-0.004)÷0.637×V 反总×106]÷(W× V 样÷V 样总) ÷T
=101.5× (ΔA-0.004) ÷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）=[(ΔA-0.004)÷0.637×V 反总×106]÷(500×V 样÷V 样总) ÷T
=0.203× (ΔA-0.004)

V 反总：反应体系总体积，1.2×10-4 L； V 样：加入样本体积，0.05 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。

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