

叶绿体复合体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：

叶绿体复合体V又称 F_1F_0 -ATP 合酶，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。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。

组成：

产品名称	OP027-25T/12S	Storage
试剂一：液体	25ml	-20°C
试剂二：粉剂	1 支	-20°C
试剂三：液体	6ml	4°C
试剂四：粉剂	1 瓶	4°C
试剂五：粉剂	1 瓶	4°C
试剂六：粉剂	1 瓶	4°C
试剂七：液体	10ml	室温
说明书	一份	

试剂二：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；

试剂四：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；

试剂五：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；

试剂六：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 H_2O : 试剂五:试剂六:试剂七=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。

需自备仪器和用品：



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。

叶绿体的提取：

- 1、称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1ml 试剂一，用冰浴匀浆器或研钵匀浆，很快研磨或捣碎，30 秒内完成，使之成为匀浆液。
- 2、将匀浆液于 200g（离心率），4°C 离心 1min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，1500g，4°C 离心 5min。
- 4、弃上清液，于沉淀中加入 0.5ml 试剂一混匀配成叶绿体悬浮液。混匀后测定叶绿体酶活性。

测定步骤：

1、酶促反应

试剂名称 (μl)	对照管	测定管
试剂二	25	25
试剂三	100	100
样本		125
混匀，37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）准确水浴 30min		
试剂四	50	50
样本	125	

混匀，4000g，25°C 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 $\Delta A = A$ 测定管 - A 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。

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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.004) \div 1.274 \times V_{\text{反总}} \times 106] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 31.37 \times \\ &(\Delta A - 0.004) \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (nmol/min/10^4 cell)} &= [(\Delta A - 0.004) \div 1.274 \times V_{\text{反总}} \times 106] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.063 \times \\ &(\Delta A - 0.004) \end{aligned}$$



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，0.5 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。

