

叶绿体复合体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：

叶绿体复合体V又称 F_1F_0 -ATP 合酶。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 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	OP028-100T/48S	Storage
试剂一：液体	100ml	-20°C
试剂二：粉剂	1 支	-20°C
试剂三：液体	8ml	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；临用前加入 2ml 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 4ml 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 H₂O: 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。

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



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线：0518-81263339

官网：<http://www.bio149.com>

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（在 EP 管中加入下列试剂）

试剂名称 (μl)	对照管	测定管
试剂二	10	10
试剂三	40	40
样本		50
混匀，37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）准确水浴 30min:		
试剂四	20	20
样本	50	

混匀，4000g，25°C 离心 10min，取上清液

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 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管设一个对照管。

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 $y = 1.274x + 0.004$ ；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。

$$\text{复合体 V 活性 (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A - 0.004) \div 1.274 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 62.8 \times (\Delta A - 0.004) \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{复合体 V 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.004) \div 1.274 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 31.37 \times (\Delta A - 0.004) \div W$$

(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) $=[(\Delta A-0.004) \div 1.274 \times V_{\text{反总}} \times 106] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.063 \times (\Delta A-0.004)$

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, 0.5 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。

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) $=[(\Delta A-0.004) \div 0.637 \times V_{\text{反总}} \times 106] \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T = 125.6 \times (\Delta A-0.004) \div Cpr$

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) $=[(\Delta A-0.004) \div 0.637 \times V_{\text{反总}} \times 106] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 62.74 \times (\Delta A-0.004) \div W$

(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) $=[(\Delta A-0.004) \div 0.637 \times V_{\text{反总}} \times 106] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.126 \times (\Delta A-0.004)$

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, 0.5 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。

