

线粒体呼吸链复合体V/ATP合酶活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 50mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 6mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 3mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂六	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂七	液体 10mL×1 瓶	常温保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

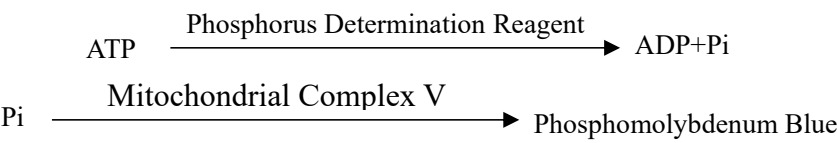
1. 试剂二：临用前每支加入 1.11 mL 双蒸水，充分溶解备用，分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
2. 试剂五：临用前加入 10mL 双蒸水，充分溶解；-20℃可保存 4 周；
3. 试剂六：临用前加入 10mL 双蒸水，充分溶解；2-8℃可保存 4 周；
4. 标准品：10 μmol/mL 磷标液，临用前取 50μL 10 μmol/mL 磷标液，加入 1950μL 蒸馏水，充分混匀，配制成 0.25μmol/mL 标准液使用，现用现配（实验中每管需要 40μL，为减小实验误差，故配制大体积）；
5. 定磷试剂的配制：根据用量将 H₂O：试剂五：试剂六：试剂七=20mL:10mL:10mL:10mL（约 100T）混合备用，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、玻璃棒和玻璃移液器，或者一次性塑料器皿，以避免磷污染。

产品说明：

线粒体复合体V又称 F₁F₀-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。

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。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

台式离心机、可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、微量玻璃比色皿/96 孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 1. 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1.0 mL 提取液，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2. 4 °C 600g 离心 10min，弃沉淀。
- 3. 将上清液移至另一离心管中，4 °C 11000g 离心 15min，得到上清液和沉淀。
- 4. 上一步结果得到的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 600μL 试剂一，超声波破碎（功率 200W，超声 5 秒，间隔 10 秒，重复 12 次），用于复合体V 酶活性测定，并且用于蛋白含量测定。

二、测定步骤

- 1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min 以上，调节波长至660nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2. 样本测定：

(1) 酶促反应

试剂名称（μL）	对照管	测定管	标准管	空白管
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，8000rpm，室温离心10min，取上清液				

(2) 定磷

上清液	40	40	-	-
标准溶液	-	-	40	-
蒸馏水	-	-	-	40
定磷试剂	200	200	200	200

混匀，40°C水浴 10min，尽快在 660nm 测定吸光值，分别记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管、A 空白管，计算ΔA 测定=A 测定管-A 对照管，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。空白管和标准管只需做 1-2 次。

三、复合体V活性计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

复合体V活性（U/mg prot）=ΔA 测定÷ΔA 标准×C 标准×V 酶促×1000÷（Cpr×V 样本）÷T
=20×ΔA 测定÷ΔA 标准÷Cpr

C 标准：标准溶液浓度，0.25μmol/mL；1000：单位换算系数，1μmol=1000nmol；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL，需自行测定；V 样本：样本体积，0.05mL；V 酶促：酶促反应总体积，0.12mL；T：反应时间，30min。

注意事项:

1. 为保证实验结果的准确性, 需先取 1-2 个样做预实验, 如果测定的吸光值过高 (高于 1), 可用蒸馏水稀释上清液后再测定。计算结果时注意乘以稀释倍数。
2. 由于提取液中含有蛋白(约 1mg/mL), 所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量(单独测定)。
3. 测定胞浆时, 定磷后反应液可能会有絮凝产生, 测定前混合均匀即可, 并不影响测定结果。
4. **推荐使用样本蛋白浓度计算酶活**, 若用样本质量计算, 则需加测胞浆提取物酶活, 上清和沉淀酶活之和方为总酶活。
5. 本试剂盒试剂足够完成 100 管反应。
6. 附:使用样本重量计算公式: (样本检测数为 100T/24S)

A、上清中复合体V活力的计算:

单位的定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{复合体V活性 (U/g 质量)} &= \Delta A1 \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准} \times V \text{ 酶促} \times 1000 \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样本}) \div T \\ &= 20 \times \Delta A1 \div \Delta A \text{ 标准} \div W\end{aligned}$$

$\Delta A1$: 上清测定值; $C \text{ 标准}$: 标准溶液浓度, 0.25 $\mu\text{mol/mL}$; 1000: 单位换算系数, 1 $\mu\text{mol}=1000\text{nmol}$; $V \text{ 提取}$: 加入提取液体积, 1.0mL; $V \text{ 样本}$: 样本体积, 0.05mL; $V \text{ 酶促}$: 酶促反应总体积, 0.12mL; T : 反应时间, 30min。

B、沉淀中复合体V活力的计算:

单位的定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{复合体V活性 (U/g 质量)} &= \Delta A2 \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准} \times V \text{ 酶促} \times 1000 \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样本}) \div T \\ &= 12 \times \Delta A2 \div \Delta A \text{ 标准} \div W\end{aligned}$$

$\Delta A2$: 沉淀测定值; $C \text{ 标准}$: 标准溶液浓度, 0.25 $\mu\text{mol/mL}$; 1000: 单位换算系数, 1 $\mu\text{mol}=1000\text{nmol}$; $V \text{ 提取}$: 沉淀重悬体积, 0.6mL; $V \text{ 样本}$: 样本体积, 0.05mL; $V \text{ 酶促}$: 酶促反应总体积, 0.12mL; T : 反应时间, 30min。

C、样本复合体V总活力的计算:

样本复合体V总活力即为上清中复合体V活力与沉淀中复合体V活力之和。

按样本质量计算: 复合体V (U/g 质量) = $20 \times \Delta A1 \div \Delta A \text{ 标准} \div W + 12 \times \Delta A2 \div \Delta A \text{ 标准} \div W$

实验实例:

1. 取 0.1g 兔子肾脏进行样本处理, 上清液和沉淀都稀释 4 倍后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得 $\Delta A \text{ 标准}=A \text{ 标准管}-A \text{ 空白管}=0.379-0.047=0.332$, 上清液的 $\Delta A1=A \text{ 测定管}-A \text{ 对照管}=0.679-0.119=0.560$, 沉淀的 $\Delta A2=A \text{ 测定管}-A \text{ 对照管}=0.773-0.052=0.721$, 则按样本质量计算得:
上清中复合体V活性 (U/g 质量) = $20 \times \Delta A1 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 4$ (稀释倍数) = 1349.4 U/g 质量
沉淀中复合体V活性 (U/g 质量) = $12 \times \Delta A2 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 4$ (稀释倍数) = 1042.4 U/g 质量
复合体V (U/g 质量) = $20 \times \Delta A1 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 4 + 12 \times \Delta A2 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 4 = 2391.8$ U/g 质量。
2. 取 0.1g 冬青进行样本处理, 上清液和沉淀都稀释 2 倍后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得 $\Delta A \text{ 标准}=A \text{ 标准管}-A \text{ 空白管}=0.379-0.047=0.332$, 上清液的 $\Delta A1=A \text{ 测定管}-A \text{ 对照管}=0.535-0.320=0.215$, 沉淀的 $\Delta A2=A \text{ 测定管}-A \text{ 对照管}=0.357-0.089=0.268$, 则按样本质量计算得:
上清中复合体V活性 (U/g 质量) = $20 \times \Delta A1 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 2$ (稀释倍数) = 259.04 U/g 质量
沉淀中复合体V活性 (U/g 质量) = $12 \times \Delta A2 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 2$ (稀释倍数) = 193.73 U/g 质量
复合体V (U/g 质量) = $20 \times \Delta A1 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 2 + 12 \times \Delta A2 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 2 = 452.77$ U/g 质量。