

线粒体复合体V试剂盒说明书

(微板法 48 样)

一、产品简介：

线粒体呼吸链复合体 V，通常称为 ATP 合成酶 (ATP synthase)、F 型 ATP 酶 (F type ATPase) 和 F1F0ATP 酶 (F1F0ATPase)，是线粒体氧化磷酸化的终极反应。复合物 V 的主要功能在于产生大部分细胞所需要的能量 ATP。在动物中该酶异常会导致心肌和神经系统疾病。

线粒体呼吸链复合体 V (F1F0ATP 酶) 催化 ADP 和 Pi 反应生成 ATP，通过己糖激酶和磷酸葡萄糖脱氢酶的相继作用，伴随着 NADP⁺ 还原成 NADPH，通过检测 340nm 处 NADPH 的增加速率即可得出线粒体复合体 V 合成 ATP 的酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 60mL×1 瓶	-20°C 保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	-20°C 保存	
试剂三	液体 μL×1 支	-20°C 保存	
试剂四	粉剂×1 支	4°C 保存；	前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂五	粉剂×1 支	-20°C 保存	前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂六	粉剂×1 支	-20°C 保存	前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂七	液体 18mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂八	粉剂×1 支	4°C 保存；	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、低温台式离心机、研钵、冰和蒸馏水。

四、线粒体复合体V活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、线粒体制备（提示：整个线粒体的提取过程须保持 4°C 低温环境）：

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌/细胞，加入 1mL 试剂一，用冰浴匀浆器或研钵匀浆，转移至离心管后于 4°C×700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀，上清液移至另一离心管中，4°C×12000g 离心 10min。沉淀即为提取的线粒体，用作第④步操作。
- ③ (选做) 上步得到的上清液即为胞浆提取物，可作为样本用于测定从线粒体泄漏的线粒体呼吸链复合体 V，用于判断线粒体提取效果。
- ④ 在沉淀（线粒体）中加入 200μL 试剂二和 2μL 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），液体置于冰上用于线粒体复合体 V 酶活性测定。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例进行提取，或按照细菌/细胞数量 (10⁴)：提取液 (mL) 为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 将下表体系用到的所有试剂置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）于恒温振荡培养箱或水浴锅中孵育 15min；

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管	对照管
样本	20	20
试剂四	10	10
试剂五	10	10
试剂六	10	10
试剂七	140	140
混匀，置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）下孵育 10min		
试剂八	10	
试剂七		10
混匀，立即于 340nm 处读取各管 A1，置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种），15min 后读取 A2， $\Delta A = (A2 - A1)_{\text{测定}} - (A2 - A1)_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】若 ΔA 的值在零附近徘徊，可以增加样本加样体积（如 40 μL ，试剂七相应减少），或延长反应时间（如增至 10min），则改变后的加样体积 V1 或反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体V活性 (nmol/min /mg prot)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 214.4 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体V活性 (nmol/min /g 鲜重)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 43.4 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

3、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体V活性 (nmol/min /} 10^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.087 \times \Delta A \end{aligned}$$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，0.202 mL V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---

反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T---反应时间，15min；

W---样本质量，g；

500--细胞或细菌总数，500 万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。