

线粒体复合体 V 活性测定说明书

(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, 也可逆过程水解 ATP。在动物中该酶异常会导致心肌和神经系统疾病。

利用线粒体呼吸链复合体 V 可水解 ATP 产生 ADP 和 Pi 的功能, 通过测定 Pi 增加速率来测定线粒体复合体V的酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 0.3mL×1 支	4°C保存	
试剂四	液体 16mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	粉剂×1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉末全部落入试管底部, 加入 2.2mL 蒸馏水, 混匀备用。
试剂六	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂七	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 2mL×1 瓶	4°C保存	临用前在试剂 A 中加 1.8mL 的 B 液, 再加 23.2mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

【注】:全程需无磷环境; 试剂配置最好用新枪头和玻璃移液器等, 也可用一次性塑料器皿, 避免磷污染。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、线粒体复合体 V 活性检测：

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 (若漂浮有脂肪, 可用枪头去除)。
- 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 200 μ L 试剂二和 2 μ L 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(10^4): 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 700nm, 所有试剂解冻至室温(25°C)。
- ② 将试剂四和五和六置于 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; 在 EP 管中依次加入：

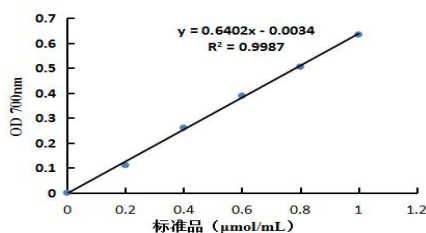
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂四	160	160
样本	20	
试剂五	20	20
混匀后置于 37°C(哺乳动物)或 25°C(其它物种), 准确反应 30min。		
试剂六	100	100
样本		20
混匀, 12000rpm, 4°C离心 5min, 上清液待测		

③ 显色反应, 在 96 板中加入:

上清液	50	50
试剂七	200	200
混匀, 室温静置 3min, 700nm 下读取各管吸光值, ΔA=A 测定-A 对照 (每个样本做一个自身对照)。		

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.6402x - 0.0034$, x 是标准品摩尔质量 ($\mu\text{mol/mL}$), y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算:

定义: 每小时每毫克组织蛋白分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 46.86 \times (\Delta A + 0.0034) \div Cpr \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 9.47 \times (\Delta A + 0.0034) \div W \end{aligned}$$

4、按细菌或细胞密度计算:

定义: 每小时每 1 万个细菌或细胞分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.02 \times (\Delta A + 0.0034) \end{aligned}$$

V---提取液体积, 0.202 mL; V1---样本体积, 0.02mL; V2---酶促反应总体积, 0.3mL;

T---反应时间, 1/2 小时;

W---样本鲜重, g;

500---细菌或细胞总数, 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。

附: 标准曲线制作过程:

1. 制备标准品母液 ($5\mu\text{mol/mL}$): 标准品用 10mL 试剂一溶解。(母液需在两天内用)。

2. 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. $\mu\text{mol/mL}$ 。

3. 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。