

## 线粒体复合体V试剂盒说明书

(货号: G0849F 分光法 24 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<sup>+</sup>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 30mL×1 瓶 | -20℃保存 |                                    |
| 试剂二  | 液体 5mL×1 瓶  | -20℃保存 |                                    |
| 试剂三  | 液体 μL×1 支   | -20℃保存 |                                    |
| 试剂四  | 粉剂×1 支      | 4℃保存;  | 前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.8mL 蒸馏水溶解备用。  |
| 试剂五  | 粉剂×1 支      | -20℃保存 | 前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.8mL 蒸馏水溶解备用。  |
| 试剂六  | 粉剂×1 支      | -20℃保存 | 前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.7mL 蒸馏水溶解备用。  |
| 试剂七  | 液体 27mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                    |
| 试剂八  | 粉剂×1 支      | 4℃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:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(光径 1cm)、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℃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℃×700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4℃×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(10<sup>4</sup>): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

#### 2、上机检测:

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 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；在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

| 试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）  | 测定管 | 对照管 |
|--|-----|-----|
| 样本   | 60  | 60  |
| 试剂四  | 30  | 30  |
| 试剂五  | 30  | 30  |
| 试剂六  | 30  | 30  |
| 试剂七  | 520 | 520 |
| 混匀，置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）下孵育 10min  |     |     |
| 试剂八  | 30  |     |
| 试剂七  |     | 30  |
| 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，<br>$\Delta A = (A2 - A1)_{\text{测定}} - (A2 - A1)_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。 |     |     |

## 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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (nmol/min / mg prot)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 125.1 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

### 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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (nmol/min / g 鲜重)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 25.3 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

### 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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (nmol/min / } 10^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.05 \times \Delta A \end{aligned}$$

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d---光径，1cm；

V--- 加入提取液体积，0.202mL

V1--- 加入样本体积，0.06mL；

V2---反应体系总体积， $7 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

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。