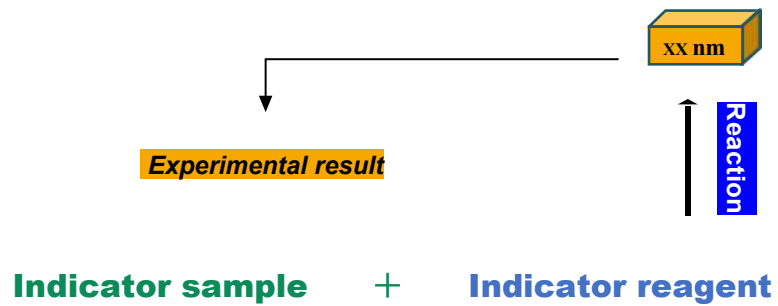


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

线粒体呼吸链复合体V活性测试盒说明书

微量法

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：

线粒体复合体V又称 F_1F_0 -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。

测定原理：

复合体V水解ATP产生ADP和 P_i ，通过测定 P_i 增加速率来测定复合体V活性。

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。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	100mL×1瓶	-20℃保存	-
试剂二	80mL×1瓶	-20℃保存	-
试剂三	2mL×1瓶	-20℃保存	-
试剂四	粉剂×1支	-20℃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℃保存；
试剂五	8mL×1瓶	4℃保存	-
试剂六	粉剂×1瓶	4℃保存	临用前加入4mL蒸馏水，充分混匀；溶解后4℃保存一周
试剂七	粉剂×1瓶	4℃保存	临用前加入10mL蒸馏水，充分混匀；溶解后4℃保存一周
试剂八	粉剂×1瓶	4℃保存	临用前加入10mL蒸馏水，充分混匀；溶解后4℃保存一周
试剂九	液体 10mL×1瓶	室温保存	-

定磷试剂的配制：按 H_2O : 试剂七:试剂八:试剂九=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。

样本的前处理:

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离:

- ① 准确称取0.1g组织或收集500万细胞，加入1mL试剂一和10uL试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- ② 将匀浆 600g，4℃离心 5min。
- ③ 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心 10min。
- ④ 上清液即为除去线粒体的胞浆蛋白，可用于测定从线粒体泄漏的复合体V（此步可选做）。
- ⑤ 步骤④中的沉淀即为线粒体，加入800uL试剂二和8uL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），用于复合体V酶活性测定。

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
试剂四	20	20
试剂五	80	80
样本		100
混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确水浴 30min		
试剂六	40	40
样本	100	

混匀，4000g，25℃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 $y = 1.2487x + 0.0361$; 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1nmol无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\text{复合体V活性 (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0361) \div 1.2487 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 64 \times (\Delta A - 0.0361) \div C_{\text{pr}}$$

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1nmol无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\text{复合体V活性 (nmol/min /g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.0361) \div 1.2487 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 51.7 \times (\Delta A - 0.0361) \div W$$

(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1nmol无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\text{复合体V活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A - 0.0361) \div 1.2487 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.103 \times (\Delta A - 0.0361)$$

V 反总：反应体系总体积， 2.4×10^{-4} L； V 样：加入样本体积，0.1 mL； V 样总：加入提取液体积，0.808 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 $y = 0.624x + 0.0361$ ； 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1nmol无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体V活性 (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.0361) \div 0.624 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 128 \times (\Delta A - 0.0361) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。