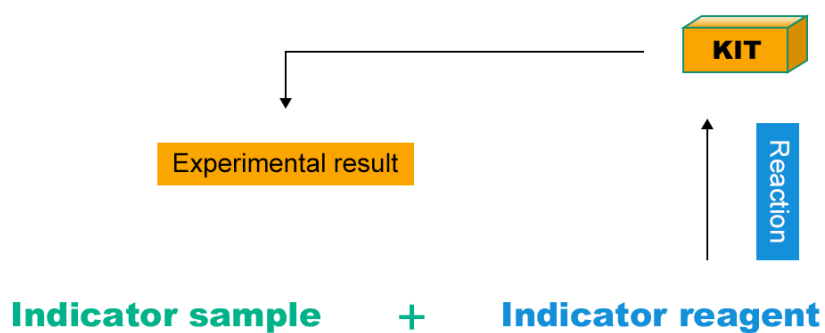


上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0475

Size: 100T/48S

## 线粒体呼吸链复合体 V 检测试剂盒说明书

### 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

#### 一、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。

#### 二、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。

#### 三、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。

#### 四、试剂的组成和配置：

| 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 H2O: 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。

## 五、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。

## 六、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。

## 七、复合体 V 活性计算：

### ● 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。

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。

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。

复合体 V 活性 (nmol/min/10<sup>4</sup> 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<sup>-4</sup> 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。

### ● 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。

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

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。

复合体 V 活性 (nmol/min/g 鲜重) =  $[(\Delta A - 0.0361) \div 0.624 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 103.4 \times (\Delta A - 0.0361) \div W$

### (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 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

复合体 V 活性 (nmol/min /  $10^4$  cell) =  $[(\Delta A - 0.0361) \div 0.624 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.206 \times (\Delta A - 0.0361)$

V 反总：反应体系总体积， $2.4 \times 10^{-4}$  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，5