

线粒体复合体 V 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：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 F_1 和 F_0 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：

试剂一：100mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂二：80mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂三：2 mL×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	10	10
试剂五	40	40
样本		50

混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确水浴 30min

试剂六	20	20
样本	50	

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 $y = 1.274x + 0.004$; 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 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.004) \div 1.274 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 62.8 \times (\Delta A - 0.004) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (nmol/min /g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.004) \div 1.274 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 50.7 \times \\ &(\Delta A - 0.004) \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A - 0.004) \div 1.274 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.101 \times \\ &(\Delta A - 0.004) \end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 1.2×10^{-4} L; V 样: 加入样本体积, 0.05 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 $y = 0.637x + 0.004$; x 为标准品浓度 (mmol/L), y 为 A 值。

(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 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (nmol/min /mg prot)} &= [(\Delta A - 0.004) \div 0.637 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 125.6 \times (\Delta A - 0.004) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (nmol/min /g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.004) \div 0.637 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 101.5 \times (\Delta A - 0.004) \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A - 0.004) \div 0.637 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.203 \times (\Delta A - 0.004) \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积， 1.2×10^{-4} L； V 样：加入样本体积，0.05 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。