

线粒体复合体 V 活性测定说明书

(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,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 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 0.2mL×1 支	4℃保存	
试剂四	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉末全部落入试管底部,加入 1.2mL 蒸馏水,混匀备用。
试剂六	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂七	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 3mL×1 瓶	4℃保存	临用前在试剂 A 中加 2.9mL 的 B 液,再加 37.1mL 的蒸馏水,混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、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℃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(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℃×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 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 700nm,蒸馏水调零。
- ② 将试剂四和五和六置于 37℃(哺乳动物)或 25℃(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：

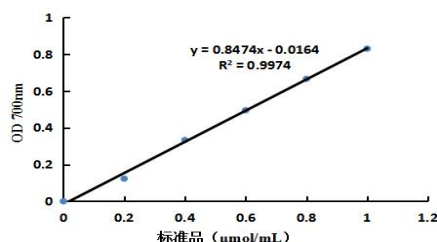
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂四	160	160
样本	20	
试剂五	20	20
混匀后置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种)，准确反应 30min。		
试剂六	100	100
样本		20
混匀，12000rpm，4°C 离心 5min，上清液待测		

③ 显色反应，在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中加入：

上清液	150	150
试剂七	600	600
混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.8474x - 0.0164$ ，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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 35.4 \times (\Delta A + 0.0164) \div Cpr \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 7.15 \times (\Delta A + 0.0164) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.014 \times (\Delta A + 0.0164) \end{aligned}$$

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，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。

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。