

线粒体复合体 V/ATP 合成酶(磷钼酸比色法)试剂盒说明书

(货号: BP10495W 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 0.3mL×1 支	-20℃避光保存	
试剂四	液体 16mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动用一甩); 2. 加入 2.2mL 蒸馏水, 混匀备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂六	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂七	A:粉体 1 瓶 B:液体 3mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前在试剂 A 中加 2.86mL 的 B 液, 再加 22.14mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用; 2. 需避光, 现配现用, 变蓝色不能使用。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

【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、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

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 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

(10⁴)：提取液 (mL) 为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 700nm，所有试剂解冻至室温 (25℃)。
- 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：

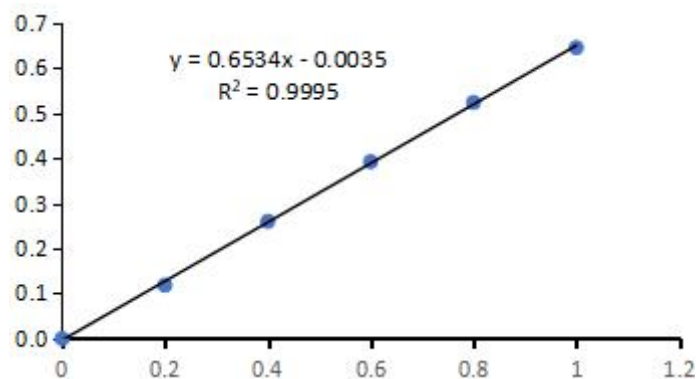
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
试剂四	160	160
样本	20	
试剂五	20	20
混匀后置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种)，准确反应 30min。		
试剂六	100	100
样本		20
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测		

- ③ 显色反应，在 96 板中加入：

上清液	50	50
试剂七	200	200
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： $y = 0.6534x - 0.0035$ ，x 是标准品摩尔质量 (μmol/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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性} (\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0035) \div 0.6534 \times V_2] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 45.9 \times (\Delta A + 0.0035) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性} (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0035) \div 0.6534 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 9.27 \times (\Delta A + 0.0035) \div W \end{aligned}$$

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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{复合体 V 活性} (\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0035) \div 0.6534 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T$$

$$=0.019 \times (\Delta A + 0.0035)$$

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, 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 标准品用 10mL 试剂一溶解。（母液需在两天内用），标准品母液浓度为 5 μ mol/mL。将母液用试剂一稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 200uL，加入 800uL 试剂一，混匀得到 1 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
蒸馏水		50
试剂七	200	200
混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		