

## 线粒体复合体 V/ATP 合成酶(合成作用)试剂盒说明书

(货号: BP10495F-24 紫外法 24 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。在动物中该酶异常会导致心肌和神经系统疾病。

线粒体呼吸链复合体 V (F1F0ATP 酶) 催化 ADP 和 Pi 反应生成 ATP, 通过己糖激酶和磷酸葡萄糖脱氢酶的相继作用, 伴随着 NADP<sup>+</sup>还原成 NADPH, 通过检测 340nm 处 NADPH 的增加速率即可得出线粒体复合体 V 合成 ATP 的酶活性大小。

### 二、试剂盒组分与配制:

| 试剂组分 | 试剂规格        | 存放温度     | 注意事项                                                                            |
|------|-------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 试剂一  | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃保存     |                                                                                 |
| 试剂二  | 液体 5mL×1 瓶  | -20℃保存   |                                                                                 |
| 试剂三  | 液体 1 支      | -20℃避光保存 |                                                                                 |
| 试剂四  | 粉剂 1 支      | -20℃避光保存 | 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底;<br>2. 加入 1.8mL 蒸馏水溶解备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂五  | 粉剂 1 支      | -20℃保存   | 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底;<br>2. 加入 1.8mL 蒸馏水溶解备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂六  | 粉剂 1 支      | -20℃保存   | 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底;<br>2. 加入 1.7mL 蒸馏水溶解备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂七  | 液体 27mL×1 瓶 | 4℃保存     |                                                                                 |
| 试剂八  | 粉剂 1 支      | 4℃保存     | 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底;<br>2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |

### 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)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、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。

- 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（10<sup>4</sup>）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

## 2、检测步骤：

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- ② 将下表体系用到的所有试剂置于 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 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

| 试剂组分（μL）                                                                                            | 测定管 | 对照管 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 样本                                                                                                  | 60  | 60  |
| 试剂四                                                                                                 | 30  | 30  |
| 试剂五                                                                                                 | 30  | 30  |
| 试剂六                                                                                                 | 30  | 30  |
| 试剂七                                                                                                 | 520 | 520 |
| 混匀，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）下孵育 10min                                                                 |     |     |
| 试剂八                                                                                                 | 30  |     |
| 试剂七                                                                                                 |     | 30  |
| 混匀，立即于 340nm 处读取各管 A1，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种），15min 后读取 A2，<br>ΔA=（A2-A1）测定-（A2-A1）对照（每个样本做一个自身对照）。 |     |     |

【注】若ΔA 的值在零附近徘徊，可以增加样本加样体积（如 100μL，试剂七相应减少），或延长反应时间（如增至 10min），则改变后的加样体积 V1 或反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

### 1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{复合体V活性 (nmol/min /mg prot)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 125.1 \times \Delta A \div Cpr\end{aligned}$$

### 2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{复合体V活性 (nmol/min /g 鲜重)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 25.3 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

### 3、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{复合体V活性 (nmol/min /10}^4\text{ cell)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.05 \times \Delta A\end{aligned}$$

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;       $d$ ---光径,  $1 \text{ cm}$ ;  
 $V$ ---加入提取液体积,  $0.202 \text{ mL}$        $V_1$ ---加入样本体积,  $0.06 \text{ mL}$ ;  
 $V_2$ ---反应体系总体积,  $7 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;       $T$ ---反应时间,  $15 \text{ min}$ ;  
 $W$ ---样本质量,  $\text{g}$ ;      500--细胞或细菌总数, 500 万;  
 $C_{pr}$ ---样本蛋白质浓度,  $\text{mg/mL}$ ; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。