

线粒体呼吸链复合体V/ATP 合酶活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1445

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 50mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 6mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 3mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂六	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂七	液体 10mL×1 瓶	常温保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

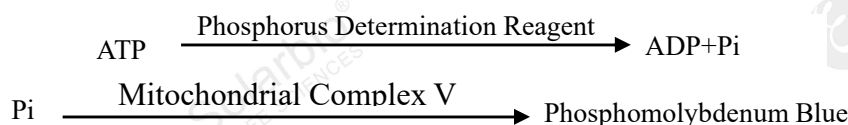
1. 试剂二：临用前每支加入 1.11 mL 蒸馏水，充分溶解备用，分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
2. 试剂五：临用前加入 10mL 蒸馏水，充分溶解；-20℃可保存 4 周；
3. 试剂六：临用前加入 10mL 蒸馏水，充分溶解；2-8℃可保存 4 周；
4. 标准品：10 μmol/mL 磷标液，临用前取 50μL 10 μmol/mL 磷标液，加入 1950μL 蒸馏水，充分混匀，配制成为 0.25μmol/mL 标准液使用，现用现配（实验中每管需要 40μL，为减小实验误差，故配制大体积）；
5. 定磷试剂的配制：根据用量将 H₂O：试剂五：试剂六：试剂七=20mL:10mL:10mL:10mL（约 100T）混合备用，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、玻璃棒和玻璃移液器，或者一次性塑料器皿，以避免磷污染。

产品说明：

线粒体复合体V又称 F₁F₀-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。

复合体V水解 ATP 产生 ADP 和 Pi，通过测定 Pi 增加速率来测定复合体V活性。





注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

台式离心机、可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、微量玻璃比色皿/96 孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1.0 mL 提取液，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 4 °C 600g 离心 10min，弃沉淀。
3. 将上清液移至另一离心管中，4 °C 11000g 离心 15min，得到上清液和沉淀。
4. 上一步结果得到的上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的复合体V（此步可选做，可以判断线粒体提取效果）。
5. 在沉淀中加入 600μL 试剂一，超声波破碎（功率 200W，超声 5 秒，间隔 10 秒，重复 12 次），用于复合体V 酶活性测定，并且用于蛋白含量测定。（试剂一含蛋白，约 1mg/mL，计算时注意需减去试剂一蛋白浓度）

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min 以上，调节波长至660nm，分光光度计蒸馏水调零。

2. 样本测定：

(1) 酶促反应

试剂名称（μL）	对照管	测定管	标准管	空白管
试剂二	10	10	-	-
试剂三	40	40	-	-
样本	-	50	-	-
混匀，37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）准确水浴30min				
试剂四	20	20	-	-
样本	50	-	-	-
混匀，8000rpm，室温离心10min，取上清液				

(2) 定磷

上清液	40	40	-	-
标准溶液	-	-	40	-
蒸馏水	-	-	-	40
定磷试剂	200	200	200	200

混匀，40°C水浴 10min，尽快在 660nm 测定吸光值，分别记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管、A 空白管，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。空白管和标准管只需做 1-2 次。

三、复合体V活性计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体V活性 (U/mg prot)} &= \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{酶促}} \times 1000 \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \div T \\ &= 20 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$



C 标准: 标准溶液浓度, 0.25 μ mol/mL; 1000: 单位换算系数, 1 μ mol=1000nmol; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL, 需自行测定; V 样本: 样本体积, 0.05mL; V 酶促: 酶促反应总体积, 0.12mL; T: 反应时间, 30min。

注意事项:

1. 为保证实验结果的准确性, 需先取 1-2 个样做预实验, 如果测定的吸光值过高 (高于 1), 可用蒸馏水稀释上清液后再测定。计算结果时注意乘以稀释倍数。
2. 测定胞浆时, 定磷后反应液可能会有絮凝产生, 测定前混合均匀即可, 并不影响测定结果。
3. **推荐使用样本蛋白浓度计算酶活**, 若用样本质量计算, 则需加测胞浆提取物酶活, 上清和沉淀酶活之和方为总酶活。
4. 本试剂盒试剂足够完成 100 管反应。
5. 附:使用样本重量计算公式: (样本检测数为 100T/24S)

A、上清中复合体V活力的计算:

单位的定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{复合体V活性 (U/g 质量)} &= \Delta A1 \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准} \times V \text{ 酶促} \times 1000 \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样本}) \div T \\ &= 20 \times \Delta A1 \div \Delta A \text{ 标准} \div W\end{aligned}$$

$\Delta A1$: 上清测定值; C 标准: 标准溶液浓度, 0.25 μ mol/mL; 1000: 单位换算系数, 1 μ mol=1000nmol; V 提取: 加入提取液体积, 1.0mL; V 样本: 样本体积, 0.05mL; V 酶促: 酶促反应总体积, 0.12mL; T: 反应时间, 30min。

B、沉淀中复合体V活力的计算:

单位的定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{复合体V活性 (U/g 质量)} &= \Delta A2 \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准} \times V \text{ 酶促} \times 1000 \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样本}) \div T \\ &= 12 \times \Delta A2 \div \Delta A \text{ 标准} \div W\end{aligned}$$

$\Delta A2$: 沉淀测定值; C 标准: 标准溶液浓度, 0.25 μ mol/mL; 1000: 单位换算系数, 1 μ mol=1000nmol; V 提取: 沉淀重悬体积, 0.6mL; V 样本: 样本体积, 0.05mL; V 酶促: 酶促反应总体积, 0.12mL; T: 反应时间, 30min。

C、样本复合体V总活力的计算:

样本复合体V总活力即为上清中复合体V活力与沉淀中复合体V活力之和。

按样本质量计算: 复合体V (U/g 质量) = $20 \times \Delta A1 \div \Delta A \text{ 标准} \div W + 12 \times \Delta A2 \div \Delta A \text{ 标准} \div W$

实验实例:

1. 取 0.1g 兔子肾脏进行样本处理, 上清液和沉淀都稀释 4 倍后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得 ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.379-0.047=0.332, 上清液的 $\Delta A1$ =A 测定管-A 对照管=0.679-0.119=0.560, 沉淀的 $\Delta A2$ =A 测定管-A 对照管=0.773-0.052=0.721, 则按样本质量计算得:
上清中复合体V活性 (U/g 质量) = $20 \times \Delta A1 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 4$ (稀释倍数) = 1349.4 U/g 质量
沉淀中复合体V活性 (U/g 质量) = $12 \times \Delta A2 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 4$ (稀释倍数) = 1042.4 U/g 质量
复合体V (U/g 质量) = $20 \times \Delta A1 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 4 + 12 \times \Delta A2 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 4 = 2391.8$ U/g 质量。
2. 取 0.1g 冬青进行样本处理, 上清液和沉淀都稀释 2 倍后按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得 ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.379-0.047=0.332, 上清液的 $\Delta A1$ =A 测定管-A 对照管=0.535-0.320=0.215, 沉淀的 $\Delta A2$ =A 测定管-A 对照管=0.357-0.089=0.268, 则按样本质量计算得:





上清中复合体V活性 (U/g 质量) = $20 \times \Delta A_1 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 2$ (稀释倍数) = 259.04 U/g 质量

沉淀中复合体V活性 (U/g 质量) = $12 \times \Delta A_2 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 2$ (稀释倍数) = 193.73 U/g 质量

复合体V (U/g 质量) = $20 \times \Delta A_1 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 2 + 12 \times \Delta A_2 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 2 = 452.77$ U/g 质量。

相关发表文献:

- [1] Wei S, Hu C, Zhang Y, Lv Y, Zhang S, Zhai H, Hu Y. AnAzf1 acts as a positive regulator of ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2023 Apr;107(7-8):2501-2514. doi: 10.1007/s00253-023-12404-8. Epub 2023 Feb 21. PMID: 36809388.
- [2] Zhou N, Qi H, Liu J, Zhang G, Liu J, Liu N, Zhu M, Zhao X, Song C, Zhou Z, Gong J, Li R, Bai X, Jin Y, Song Y, Yin Y. Deubiquitinase OTUD3 regulates metabolism homeostasis in response to nutritional stresses. *Cell Metab*. 2022 Jul 5;34(7):1023-1041.e8. doi: 10.1016/j.cmet.2022.05.005. Epub 2022 Jun 7. PMID: 35675826.
- [3] Li C, Wu B, Li Y, Chen J, Ye Z, Tian X, Wang J, Xu X, Pan S, Zheng Y, Cai X, Jiang L, Zhao M. Amino acid catabolism regulates hematopoietic stem cell proteostasis via a GCN2-eIF2 伪 axis. *Cell Stem Cell*. 2022 Jul 7;29(7):1119-1134.e7. doi: 10.1016/j.stem.2022.06.004. PMID: 35803229.

相关系列产品:

BC0510/BC0515 线粒体呼吸链复合体I活性检测试剂盒

BC3230/BC3235 线粒体呼吸链复合体II活性检测试剂盒

BC3240/BC3245 线粒体呼吸链复合体III活性检测试剂盒

BC0940/BC0945 线粒体呼吸链复合体IV活性检测试剂盒

