

线粒体呼吸链复合体V活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1401

产品规格：100管/48样

产品简介：

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。

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。

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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体50mL×1瓶	4℃
试剂一	液体50mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	液体6mL×1瓶	4℃
试剂四	粉剂×1瓶	4℃
试剂五	粉剂×1瓶	4℃
试剂六	粉剂×1瓶	4℃
试剂七	液体8mL×1瓶	室温
标准品	液体1mL×1支	4℃

溶液配制：

1. 试剂二：临用前每支加入1.11mL双蒸水，充分溶解备用，分装后-20℃保存，避免反复冻融；
2. 试剂四：临用前加入3mL双蒸水，充分混匀；
3. 试剂五：临用前加入8mL双蒸水，充分混匀；
4. 试剂六：临用前加入8mL双蒸水，充分混匀；
5. 标准品：10 μ mol/mL磷标液，临用前用蒸馏水稀释40倍即0.25 μ mol/mL磷标准液。
6. 定磷试剂的配制：按 H_2O ：试剂五：试剂六：试剂七=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、玻璃棒和玻璃移液器，或者一次性塑料器皿，以避免磷污染。

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、冰和蒸馏水。

操作步骤（仅供参考）：

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1.0mL提取液，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 4℃ 600g离心10min。
3. 将上清液移至另一离心管中，4℃ 11000g离心15min。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

4. 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600 μ L试剂一，超声波破碎（功率20%，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。

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，蒸馏水调零。
2. 样本测定：

(1) 酶促反应

试剂名称 (μ L)	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 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或25 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。

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1nmol无机磷定义为一个酶活性单位。

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

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. 由于提取液中含有蛋白（约1mg/mL），所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量(单独测定)。
3. 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。
4. 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。
5. 本试剂盒试剂足够完成100管反应。
6. 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。

$$\begin{aligned} \text{复合体V活性 (U/g质量)} &= \Delta A_1 \div \Delta A_{标准} \times C_{标准} \times V_{酶促} \times 1000 \div (W \div V_{提取} \times V_{样本}) \div T \\ &= 20 \times \Delta A_1 \div \Delta A_{标准} \div W \end{aligned}$$



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

$\Delta A1$: 上清测定值; C标准: 标准溶液浓度, $0.25\mu\text{mol/mL}$; 1000: 单位换算系数, $1\mu\text{mol}=1000\text{nmol}$; 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 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

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

$\Delta A2$: 沉淀测定值; C标准: 标准溶液浓度, $0.25\mu\text{mol/mL}$; 1000: 单位换算系数, $1\mu\text{mol}=1000\text{nmol}$; 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) $= 20 \times \Delta A1 \div \Delta A\text{标准} \div W + 12 \times \Delta A2 \div \Delta A\text{标准} \div W$ 。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com