

线粒体呼吸链复合体 V 活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Chain Complex V Activity Assay Kit

微量法

货号: AK207

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK207-A	60mL×1 瓶	-20℃保存;
AK207-B	50mL×1 瓶	-20℃保存;
AK207-C	1 mL×1 瓶	-20℃保存;
AK207-D	粉剂×1 支	-20℃保存; 临用前加入 1mL 蒸馏水, 充分溶解备用, 剩余试剂分装-20℃保存 4 周, 避免反复冻融;
AK207-E	4mL×1 瓶	4℃保存;
AK207-F	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用前加入 2mL 蒸馏水充分混匀; 4℃保存一周;
AK207-G	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用前加入 5mL 蒸馏水充分混匀; 4℃保存一周;
AK207-H	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用前加入 5mL 蒸馏水充分混匀; 4℃保存一周;
AK207-I	5mL×1 瓶	室温保存;
AK207-标准品	1mL×1 支	4℃保存 (10 μmol/mL 磷标液);
标准磷应用液 (0.5μmol/mL) 配制: 将 AK207-标准品用蒸馏水 20 倍稀释充分混匀即可		
定磷试剂的配制: 按 H ₂ O: AK207-G:H:I=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、玻棒和玻璃移液器, 或者一次性塑料器皿, 以避免磷污染。		

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 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。

原理: 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。

自备用品:

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

样品测定的前处理:

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离:

1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细菌或细胞, 加入 1mL AK207-A 和 10uL AK207-C, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 将匀浆 600g, 4℃离心 5min。
3. 弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4℃离心 10min。
4. 上清液即为除去线粒体的胞浆蛋白, 可用于测定从线粒体泄漏的复合体 V (此步可选做)。
5. 步骤 4 中的沉淀即为线粒体, 加入 800uL AK207-B 和 8uL AK207-C, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于复合体 V 酶活性测定。

测定步骤:

1. 酶促反应: 在 EP 管中加入下列试剂

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)	标准管(ul)	空白管(ul)
AK207-D	10	10		
AK207-E	40	40		
样本		50		
混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 准确水浴 30min				
AK207-F	20	20		
样本	50			
混匀, 8000rpm, 常温离心 10min, 取上清液待测				

2. 定磷, 在微量玻璃比色皿或 96 孔板中加入:

上清液	40	40		
标准磷应用液			40	
蒸馏水				40
定磷试剂	200	200	200	200

混匀, 室温反应 10min 左右, 在 660nm 处分别记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管、A 空白管, 计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管, ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。

注意: 每个测定管设一个对照管。

复合体 V 活性计算:

1. 按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

复合体 V 活性 (U/mg prot) = ΔA 测定 $\div$ ΔA 标准 $\times$ C 标准 $\times$ V 酶促 $\times 1000 \div$ (Cpr $\times$ V 样本) $\div$ T
= $40 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 $\div$ Cpr

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

2. 按样本鲜重计算 (检测样本数为 100T/24S)

单位的定义: 每 g 组织每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

复合体 V 活性 1 (U/g 质量) = $\Delta A1 \div \Delta A$ 标准 $\times$ C 标准 $\times$ V 酶促 $\times 1000 \div$ (W $\div$ V 提取 1 $\times$ V 样本) $\div$ T
= $40 \times \Delta A1 \div \Delta A$ 标准 $\div$ W

复合体 V 活性 2 (U/g 质量) = $\Delta A2 \div \Delta A$ 标准 $\times$ C 标准 $\times$ V 酶促 $\times 1000 \div$ (W $\div$ V 提取 2 $\times$ V 样本) $\div$ T
= $32 \times \Delta A2 \div \Delta A$ 标准 $\div$ W

复合体 V 总活性 (U/g 质量) = $40 \times \Delta A1 \div \Delta A$ 标准 $\div$ W + $32 \times \Delta A2 \div \Delta A$ 标准 $\div$ W

注: C 标准: 标准溶液浓度, 0.5 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; $\Delta A1$: 上清测定值; $\Delta A2$: 沉淀测定值; V 提取 1: 加入提取液体积, 1.01mL; V 提取 2: 沉淀重悬体积, 0.808mL; 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 (>1.2), 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; 若 ΔA 大于 0.4, 需将样本稀释适当倍数, 计算公式中乘以相应稀释倍数; 若 ΔA 偏小, 则可以通过增加加入的样本体积来提高灵敏度。
2. 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。