

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°C (哺乳动物) 或 25°C (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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (U/mg prot)} &= \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准} \times V \text{ 酶促} \times 1000 \div (C_{pr} \times V \text{ 样本}) \div T \\ &= 40 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div C_{pr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 1 (U/g 质量)} &= \Delta A_1 \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准} \times V \text{ 酶促} \times 1000 \div (W \div V \text{ 提取 1} \times V \text{ 样本}) \div T \\ &= 40 \times \Delta A_1 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 2 (U/g 质量)} &= \Delta A_2 \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准} \times V \text{ 酶促} \times 1000 \div (W \div V \text{ 提取 2} \times V \text{ 样本}) \div T \\ &= 32 \times \Delta A_2 \div \Delta A \text{ 标准} \div W \end{aligned}$$

$$\text{复合体 V 总活性 (U/g 质量)} = 40 \times \Delta A_1 \div \Delta A \text{ 标准} \div W + 32 \times \Delta A_2 \div \Delta A \text{ 标准} \div W$$

注：C 标准：标准溶液浓度，0.5 μmol/mL；1000：单位换算系数，1 μmol=1000 nmol；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL，需自行测定；V 样本：样本体积，0.05 mL；V 酶促：酶促反应总体积，0.12 mL； ΔA_1 ：上清测定值； ΔA_2 ：沉淀测定值；V 提取 1：加入提取液体积，1.01 mL；V 提取 2：沉淀重悬体积，0.808 mL；T：反应时间，30 min。

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。

3. 最好采用新鲜样本进行测定，以准确反映该指标活性。