

线粒体呼吸链复合体 V 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: BC1440

规格: 25T/12S、50T/24S

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	25T	50T	保存条件
提取液	液体 15 mL×1 瓶	液体 30mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	液体 30mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂三	液体 6 mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 3mL×1 瓶	液体 6mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8°C保存
试剂六	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8°C保存
试剂七	液体 10 mL×1 瓶	液体 20mL×1 瓶	常温保存
标准品	液体 1 mL×1 支	液体 1mL×1 支	2-8°C保存

25T 溶液配制:

1. 试剂二: 临用前每支加入 1.11 mL 双蒸水, 充分溶解备用, 分装后-20°C保存 4 周, 避免反复冻融;
2. 试剂五: 临用前加入 10 mL 双蒸水, 充分溶解; -20°C可保存 4 周;
3. 试剂六: 临用前加入 10 mL 水, 充分溶解; 2-8°C可保存 4 周;
4. 标准品: 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 磷标液, 临用前取 50 μL 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 磷标液, 加入 1950 μL 蒸馏水, 充分混匀, 配制成为 0.25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 标准液使用, 现用现配 (实验中每管需要 200 μL , 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 50T) 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。

50T 溶液配制:

1. 试剂二: 临用前每支加入 1.11 mL 双蒸水, 充分溶解, -20°C分装保存 4 周, 避免反复冻融;
2. 试剂五: 临用前加入 20 mL 双蒸水, 充分溶解; -20°C可保存 4 周;
3. 试剂六: 临用前加入 20 mL 双蒸水, 充分溶解; 2-8°C可保存 4 周;
4. 标准品: 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 磷标液, 临用前取 50 μL 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 磷标液, 加入 1950 μL 蒸馏水, 充分混匀, 配制成为 0.25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 标准液使用, 现用现配 (实验中每管需要 200 μL , 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 50T) 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 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。

需自备的仪器和用品：

台式离心机、可见分光光度计、水浴锅、1mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、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 1.0mL 提取液，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 4 °C 600g 离心 10min。
3. 将上清液移至另一离心管中，4 °C 11000g 离心 15min。
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. 分光光度计预热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	40	40	-	-
试剂三	160	160	-	-
样本	-	200	-	-
混匀，37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）准确水浴30min				
试剂四	80	80	-	-
样本	200		-	-
混匀，8000rpm，室温离心10min，取上清液				

(2) 定磷

上清液	200	200	-	-
标准溶液	-	-	200	-
蒸馏水	-	-		200
定磷试剂	1000	1000	1000	1000

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 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。

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。

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

C 标准：标准溶液浓度，0.25 $\mu\text{mol/mL}$ ；1000：单位换算系数，1 $\mu\text{mol}=1000\text{nmol}$ ；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL，需自行测定；V 样本：样本体积，0.2mL；V 酶促：酶促反应总体积，0.48mL；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 50 管反应。
6. 附:使用样本质量计算公式：（样本检测数为 50T/12S）

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 $\mu\text{mol/mL}$ ；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，0.2mL；V 酶促：酶促反应总体积，0.48mL；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，0.2mL；V 酶促：酶促反应总体积，0.48mL；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。

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

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 8 倍后按照测定步骤操作，测得 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} = 0.562 - 0.001 = 0.561$ ，上清液的 $\Delta A1 = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.537 - 0.177 = 0.36$ ，沉淀的 $\Delta A2 = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.558 - 0.044 = 0.514$ ，则按样本质量计算得：

$$\text{上清中复合体V活性 (U/g 质量)} = 20 \times \Delta A1 \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times 8 \text{ (稀释倍数)} = 1026.74 \text{ U/g 质量}$$

$$\text{沉淀中复合体V活性 (U/g 质量)} = 12 \times \Delta A2 \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times 8 \text{ (稀释倍数)} = 879.57 \text{ U/g 质量}$$

$$\text{复合体V (U/g 质量)} = 20 \times \Delta A1 \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times 8 + 12 \times \Delta A2 \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times 8 = 1906.31 \text{ U/g 质量。}$$

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，测得 ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.562-0.001=0.561，上清液的 $\Delta A_1=A$ 测定管-A 对照管=0.927-0.580=0.347，沉淀的 $\Delta A_2=A$ 测定管-A 对照管=0.636-0.187=0.449，则按样本质量计算得：

上清中复合体V活性 (U/g 质量) = $20 \times \Delta A_1 \div \Delta A$ 标准 $\div W \times 2$ (稀释倍数) = 247.42 U/g 质量

沉淀中复合体V活性 (U/g 质量) = $12 \times \Delta A_2 \div \Delta A$ 标准 $\div W \times 2$ (稀释倍数) = 192.09 U/g 质量

复合体V (U/g 质量) = $20 \times \Delta A_1 \div \Delta A$ 标准 $\div W \times 2 + 12 \times \Delta A_2 \div \Delta A$ 标准 $\div W \times 2 = 439.51$ U/g 质量。

相关发表文献：

[1] Qiuli OuYang, Nengguo Tao, Miaoling Zhang. A Damaged Oxidative Phosphorylation Mechanism Is Involved in the Antifungal Activity of Citral against *Penicillium digitatum*. *Frontier in Immunology*. February 2018; (IF4.259)

[2] Wang M, Zhang Y, Xu M, et al. Roles of TRPA1 and TRPV1 in cigarette smoke-induced airway epithelial cell injury model[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 134: 229-238.

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