Mitochondrial Respiratory Complex V Activity Assay Kit

线粒体复合体V/ATP 合成酶(合成作用)试剂盒说明书

货号：BN72609| 方法：紫外分光法 | 规格：24 样

一、产品简介：

线粒体呼吸链复合体 V，通常称为 ATP 合成酶（ATP synthase）、F 型 ATP 酶（F type ATPase）和 F1F0ATP 酶（F1F0ATPase），是线粒体氧化磷酸化的终极反应。复合物 V 的主要功能在于产生大部分细胞所需要的能量 ATP。在动物中该酶异常会导致心肌和神经系统疾病。

线粒体呼吸链复合体 V（F1F0ATP 酶）催化 ADP 和 Pi 反应生成 ATP，通过己糖激酶和磷酸葡萄糖脱氢酶的相继作用，伴随着 $NADP^+$还原成 NADPH，通过检测 340nm 处 NADPH 的增加速率即可得出线粒体复合体Ⅴ合成 ATP 的酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 30mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 5mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体μL×1 支	-20℃保存	
试剂四	粉剂×1 支	4℃保存；	前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 1.8mL 蒸馏水溶解备用。
试剂五	粉剂×1 支	-20℃保存	前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 1.8mL 蒸馏水溶解备用。
试剂六	粉剂×1 支	-20℃保存	前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 1.7mL 蒸馏水溶解备用。
试剂七	液体 27mL×1 瓶	4℃保存	
试剂八	粉剂×1 支	4℃保存；	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、可调式移液器、低温台式离心机、研钵、冰和蒸馏水。

四、线粒体复合体Ⅴ活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、线粒体制备（提示：整个线粒体的提取过程须保持 4℃低温环境）：

① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌/细胞，加入 1mL 试剂一，用冰浴匀浆器或研钵匀浆，转移至离心管后于 4℃×700g 离心 10min。

② 弃沉淀，上清液移至另一离心管中，4℃×12000g 离心 10min。沉淀即为提取的线粒体，用作第④步操作。

③ (选做) 上步得到的上清液即为胞浆提取物，可作为样本用于测定从线粒体泄漏的线粒体呼吸链复合体V，用于判断线粒体提取效果。

④ 在沉淀（线粒体）中加入200μL试剂二和2μL试剂三，超声波破碎（冰浴，功率20%或200W，超声3s，间隔10秒，重复30次），液体置于冰上**用于线粒体复合体Ⅴ酶活性测定。**

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取，或按照细

菌/细胞数量（10^4）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、上机检测：

① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

② 将下表体系用到的所有试剂置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）于恒温振荡培养箱或水浴锅中孵育 15min；在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	60	60
试剂四	30	30
试剂五	30	30
试剂六	30	30
试剂七	520	520
混匀，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）下孵育 10min		
试剂八	30	
试剂七		30
混匀，**立即**于 340nm 处读取各管 A1，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种），15min 后读取 A2， △A=（A2-A1）测定-（A2-A1）对照（每个样本做一个自身对照）。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

复合体Ⅴ活性（nmol/min /mg prot）=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(V1×Cpr)÷T

=125.1× ΔA ÷Cpr

2、 按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

复合体V活性（nmol/min /g 鲜重）=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(W× V1÷V)÷T

=25.3× ΔA ÷W

3、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

复合体V活性（nmol/min /10^4 cell）=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(500×V1÷V)÷T

=0.05× ΔA

ε---NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm；　　d---光径，1cm；

V---加入提取液体积，0.202mL　　V1---加入样本体积，0.06mL；

V2---反应体系总体积，7×10^{-4} L；　　T---反应时间，15min；

W---样本质量，g；　　500--细胞或细菌总数，500 万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。