Mitochondrial Respiratory Complex V Activity Assay Kit

线粒体复合体V/ATP 合成酶(分解作用)试剂盒说明书(磷钼酸比色法)

货号：BN72610 | 方法：微板法 | 规格：48 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，也可逆过程水解 ATP。在动物中该酶异常会导致心肌和神经系统疾病。

利用线粒体呼吸链复合体 V 可水解 ATP 产生 ADP 和 Pi 的功能，通过测定 Pi 增加速率来测定线粒体复合体V的酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 0.3mL×1 支	4℃保存	
试剂四	液体 16mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉末全部落入试管底部，加入 2.2mL 蒸馏水，混匀备用。
试剂六	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂七	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 2mL×1 瓶	4℃保存	临用前在试剂 A 中加 1.8mL 的 B 液，再加 23.2mL 的蒸馏水，混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

【注】:全程需无磷环境；试剂配置最好用新枪头和玻璃移液器等，也可用一次性塑料器皿，避免磷污染。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、线粒体复合体 V 活性检测：

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（若漂浮有脂肪，可用枪头去除）。

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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 700nm，所有试剂解冻至室温（25℃）。

② 将试剂四和五和六置于 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 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
试剂四	160	160
样本	20	
试剂五	20	20
混匀后置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种），准确反应 30min。		
试剂六	100	100
样本		20
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测		

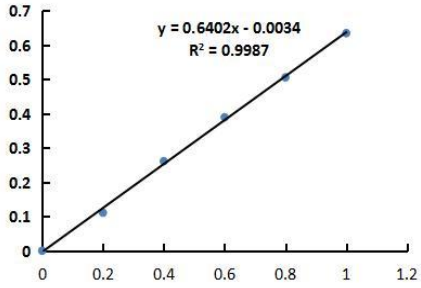
③ 显色反应，在 96 板中加入：

上清液	50	50
试剂七	200	200
混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值，△A=A 测定-A 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、标准曲线方程：y = 0.6402x - 0.0034，x 是标准品摩尔质量（μmol/mL），y 是△A。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

2、按蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

复合体 V 活性(μmol/h/mg prot)=[(△A+0.0034)÷0.6402×V2]÷(V1×Cpr)÷T

=46.86×(△A+0.0034)÷Cpr

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

复合体 V 活性(μmol/h/g 鲜重)=[(△A+0.0034)÷0.6402×V2]÷(W×V1÷V)÷T

=9.47× (△A+0.0034)÷W

4、按细菌或细胞密度计算：

定义：每小时每 1 万个细菌或细胞分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

复合体 V 活性(μmol/h/10^4 cell)=[(△A+0.0034)÷0.6402×V2]÷(500×V1÷V)÷T

$$=0.02\times(\triangle A+0.0034)$$

V---提取液体积，0.202 mL； V1---样本体积，0.02mL ； V2---酶促反应总体积，0.3mL；
T---反应时间，1/2 小时； W---样本鲜重，g； 500---细菌或细胞总数，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。