

线粒体复合体V试剂盒说明书

分光光度法 25 管/12 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

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。

测定原理

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。

需自备的仪器和用品

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

试剂一: 25mL×1 瓶, -20℃ 保存;

试剂二: 25mL×1 瓶, -20℃ 保存;

试剂三: 1 mL×1 瓶, -20℃ 保存;

试剂四: 粉剂×1 支, -20℃ 保存; 临用前每支加入 1.3mL 蒸馏水, 充分溶解备用, 用不完的试剂仍-20℃ 保存;

试剂五: 6mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂六: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 3mL 蒸馏水, 充分混匀; 溶解后 4℃ 保存一周;

试剂七: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 10mL 蒸馏水, 充分混匀; 溶解后 4℃ 保存一周;

试剂八: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 10mL 蒸馏水, 充分混匀; 溶解后 4℃ 保存一周;

试剂九: 液体 10mL×1 瓶, 室温保存。

定磷试剂的配制: 按 H_2O : 试剂七:试剂八:试剂九=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。

样本的前处理:

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 试剂一和 10uL 试剂三, 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 试剂二和 8uL 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), 用于复合体 V 酶活性测定。

测定步骤**1、酶促反应**

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
试剂四	25	25
试剂五	100	100
样本		125

混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 准确水浴 30min

试剂六	50	50
样本	125	

混匀, 4000g, 25°C 离心 10min, 取上清液

2、定磷

上清液	170	170
定磷试剂	830	830

混匀, 室温静置 10min 左右, 在 660nm 处读取 A 测定管和 A 对照管, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

复合体V活性计算

标准条件下测定的回归方程为 $y = 1.274x + 0.004$; x 为标准品浓度 (mmol/L), y 为 A 值。

1、组织中复合体 V 活性的计算:**(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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.004) \div 1.274 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 62.8 \times (\Delta A - 0.004) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算

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。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.004) \div 1.274 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 50.7 \times (\Delta A - 0.004) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体 V 活性 (nmol/min / } 10^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A - 0.004) \div 1.274 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &\div T = 0.101 \times (\Delta A - 0.004) \end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 3×10^{-4} L; V 样: 加入样本体积, 0.125 mL; V 样总: 加入提取液体积, 0.808 mL; T: 反应时间, 30 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。