线粒体呼吸链复合体Ⅴ活性检测试剂盒（微量法）

（本试剂盒仅供科研使用）

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0300	线粒体呼吸链复合体Ⅴ活性检测试剂盒（微量法）	100 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 100mL ×1 瓶	-20℃
试剂二	液体 80mL ×1 瓶	-20℃
试剂三	液体 2mL ×1 瓶	-20℃
试剂四	粉剂 ×1 支：临用前加入 2mL 蒸馏水，充分溶解备用，用不完的试剂仍-20℃保存。	-20℃
试剂五	液体 8mL ×1 瓶	4℃
试剂六	粉剂 ×1 瓶：临用前加入 4mL 蒸馏水，充分溶解备用，用不完的试剂仍 4℃保存。	4℃
试剂七	粉剂 ×1 瓶：临用前加入 10mL 蒸馏水，充分溶解备用，溶解后 4℃保存 1 周。	4℃
试剂八	粉剂 ×1 瓶：临用前加入 10mL 蒸馏水，充分溶解备用，溶解后 4℃保存 1 周。	4℃
试剂九	液体 10mL ×1 瓶	室温
定磷试剂的配制：按 H2O：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：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。		

一、产品说明

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。

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。

二、自备材料

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

三、样品准备

1、准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL 试剂一和 10μL 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、上述中的沉淀即为线粒体，加入 800μL 试剂二和 8μL 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。

四、操作步骤

正式测定前，必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

1、酶促反应（在 EP 管中加入下列试剂）：

试剂名称（μL）	对照管	测定管
试剂四	20	20
试剂五	80	80
样本		100
混匀， 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确水浴 30min。		
试剂六	40	40
样本	100	
混匀，4000g，25℃离心 10min，取上清液。		

2、定磷（在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂）：

试剂名称（μL）	对照管	测定管
上清液	30	30
定磷试剂	170	170
混匀，室温静置 10min 后，在 660nm 处读取 A 测定管和 A 对照管，计算ΔA=A 测定管-A 对照管。每个测定管设一个对照管。		

五、活性的计算

A. 用 96 孔板测定的计算公式如下：

标准条件下测定的回归方程为 y=0.624x + 0.0361；x 为标准品浓度（mmoL/L），y 为 A 值。

1、按照样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1nmoL 无机磷定义为一个酶活性单位。

复合体Ⅴ活性（nmoL/min/mg prot）=[(ΔA-0.0361) ÷0.624 × V 反总 × 106]÷(V 样 × Cpr) ÷T =128 × (ΔA-0.0361) ÷Cpr。

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

2、按照样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织每分钟产生 1nmoL 无机磷定义为一个酶活性单位。

复合体Ⅴ活性（nmoL/min/g 鲜重）=[(ΔA-0.0361) ÷0.624 × V 反总 × 106]÷(W × V 样÷V 样总) ÷T =103.4 × (ΔA-0.0361) ÷W。

3、按照细菌/细胞密度计算：

单位定义：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。

复合体Ⅴ活性（nmoL/min /10^4ceLL）=[(ΔA-0.0361) ÷0.624 × V 反总 × 10^6]÷(500 × V 样÷V 样总) ÷T =0.206 × (ΔA-0.0361)。

V 反总：反应体系总体积，2.4×10^{-4} L；V 样：加入样本体积，0.1mL；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。

B. 用石英比色皿测定的计算公式如下：

标准条件下测定的回归方程为 y= 1.2487x + 0.0361；x 为标准品浓度（mmoL/L），y 为 A 值。

1、按照样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1nmoL 无机磷定义为一个酶活性单位。

复合体Ⅴ活性（nmoL/min/mg prot）=[(ΔA-0.0361）÷1.2487×V 反总×10^6]÷(样×Cpr）÷T =64×(ΔA-0.0361）÷Cpr。

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

2、按照样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织每分钟产生 1nmoL 无机磷定义为一个酶活性单位。

复合体Ⅴ活性（nmoL/min /g 鲜重）=[(ΔA-0.0361）÷1.2487×V 反总×10^6]÷(W×V 样÷V 样总)÷T =51.7×（ΔA-0.0361）÷W。

3、按照细菌/细胞密度计算：

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

复合体Ⅴ活性（nmoL/min/104ceLL）=[(ΔA-0.0361）÷1.2487×V 反总×10^6]÷(500×V 样÷V 样总)÷T =0.103×（ΔA-0.0361)。

V 反总：反应体系总体积，2.4×10^{-4} L； V 样：加入样本体积，0.1 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。