

## 线粒体呼吸链复合体V/ATP合酶/三磷酸腺苷合酶检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1104

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/24S 96T/48S

适用样本：动植物组织和细胞

### 产品简介

线粒体呼吸链复合体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，线粒体呼吸链复合体V还存在于叶绿体、异养菌和光合细菌中。线粒体呼吸链复合体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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法，用于检测生物体内线粒体呼吸链复合体V活性，其原理是线粒体呼吸链复合体V水解 ATP 产生 ADP 和 Pi，通过测定 Pi 增加速率来测定线粒体呼吸链复合体V活性。

### 产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4℃保存
试剂二	40mL	80mL	4℃保存
试剂三	1mL	2mL	4℃避光保存
试剂四	粉剂×1支	粉剂×2支	-20℃避光保存
试剂五	4mL	8mL	4℃保存
试剂六	粉剂×1瓶	粉剂×2瓶	4℃避光保存
试剂七	粉剂×1瓶	粉剂×2瓶	4℃避光保存
试剂八	粉剂×1瓶	粉剂×2瓶	4℃避光保存
试剂九	5mL	10mL	室温保存
标准品	1mL	1mL	4℃避光保存

### 自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 660nm 处的吸光度）及恒温箱

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

制冰机、低温离心机

去离子水

匀浆器

### 试剂准备

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。

试剂四：临用前配制，每瓶加入 1mL 去离子水充分溶解。未用完的试剂需分装后-20℃保存，避免反复冻融。

## 产品说明书

试剂五：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂六：临用前配制，每瓶加入 2mL 去离子水充分溶解后使用；4℃避光保存。

试剂七：临用前配制，每瓶加入 5mL 去离子水充分溶解后使用；4℃避光保存 2-3 天或分装后-20℃避光保存，避免反复冻融。

试剂八：临用前配制，每瓶加入 5mL 去离子水充分溶解后使用；4℃避光保存。

试剂九：即用型；室温保存。

定磷试剂的配制：配制比例按照 H<sub>2</sub>O : 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：配试剂最好用新的玻璃器皿或者一次性塑料器皿，以避免磷污染。**

标准曲线设置：按下表所示用去离子水将 10mM 标准品稀释为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313、0.0156 mM 的标准溶液。

	标准品体积 (μL)	去离子水体积 (μL)	标准品浓度 (mM)
Std. 1	100μL 10mM	900	1
Std. 2	100μL of Std. 1 (1mM)	100	0.5
Std. 3	100μL of Std. 2 (0.5mM)	100	0.25
Std. 4	100μL of Std. 3 (0.25mM)	100	0.125
Std. 5	100μL of Std. 4 (0.125mM)	100	0.0625
Std. 6	100μL of Std. 5 (0.0625mM)	100	0.0313
Std. 7	100μL of Std. 6 (0.0313mM)	100	0.0156

### 样本制备

**注意：推荐使用新鲜样本，以保证酶的活力。**

线粒体呼吸链复合体 V 的提取：

1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万个细胞，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂三，冰浴匀浆；
2. 离心匀浆液，600g，5min，4℃，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀；
3. 再次离心上清，11,000g，10min，4℃，沉淀即为提取的线粒体，用作第 5 步操作；
4. (选做) 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（此步可选做，可用于判断线粒体提取效果）；
5. 在沉淀中加入 800μL 试剂二和 8μL 试剂三，充分重悬沉淀，用于下一步线粒体呼吸链复合体 V 酶活性检测。

### 实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 660nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 酶促反应（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

	空白管 (μL)	标准管 (μL)	测定管 (μL)	对照管 (μL)
试剂四	0	0	10	10
试剂五	0	0	40	40
样本	0	0	50	0

混匀后盖紧，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确孵育 30min

试剂六	0	0	20	20
样本	0	0	0	50

混匀后，室温（25℃左右），4,000g，离心 10min，取上清液；

### 3. 定磷(在 96 孔板或微量玻璃比色皿中加入下列试剂)

上清	0	0	40	40
不同浓度标准品	0	40	0	0
去离子水	40	0	0	0
定磷试剂	200	200	200	200

混匀，室温静置 10min 后，测定 660nm 吸光值。计算  $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。（空白管只需做 1 管）

4. 注意：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 1.5）可用试剂二稀释样本后再测定，计算结果时注意乘以稀释倍数。

### 结果计算

#### 1. 标准曲线的绘制

以标准液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$  为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

#### 2. 无机磷 (Pi) 含量的计算

将  $\Delta A_{\text{测}}$  带入方程得到 y 值 (mM)。

#### 3. 线粒体呼吸链复合体 V 活性计算

##### (1) 按样本鲜重计算

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

上清中线粒体呼吸链复合体 V 活性的计算：

$$\text{复合体 V 上清活性 (U/g 鲜重)} = (y_{\text{上清}} \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div T = 67.33 \times y_{\text{上清}} \div W$$

沉淀中线粒体呼吸链复合体 V 活性的计算：

$$\text{复合体 V 沉淀活性 (U/g 鲜重)} = (y_{\text{沉淀}} \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{重悬}} \times W) \div T = 53.87 \times y_{\text{沉淀}} \div W$$

样本线粒体呼吸链复合体 V 总活性的计算：

样本线粒体呼吸链复合体 V 总活性即为上清中线粒体呼吸链复合体 V 活性与沉淀中线粒体呼吸链复合体 V 活性之和。

$$\text{按样本鲜重计算：线粒体呼吸链复合体 V 总活性 (U/g 鲜重)} = 67.33 \times y_{\text{上清}} \div W + 53.87 \times y_{\text{沉淀}} \div W$$

##### (2) 按细胞数量计算

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

上清中线粒体呼吸链复合体 V 活性的计算：

$$\text{复合体 V 上清活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (y_{\text{上清}} \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \div T = 0.135 \times y_{\text{上清}}$$

沉淀中线粒体呼吸链复合体 V 活性的计算：

$$\text{复合体 V 沉淀活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (y_{\text{沉淀}} \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{重悬}} \times 500) \div T = 0.108 \times y_{\text{沉淀}}$$

样本线粒体呼吸链复合体 V 总活性的计算：

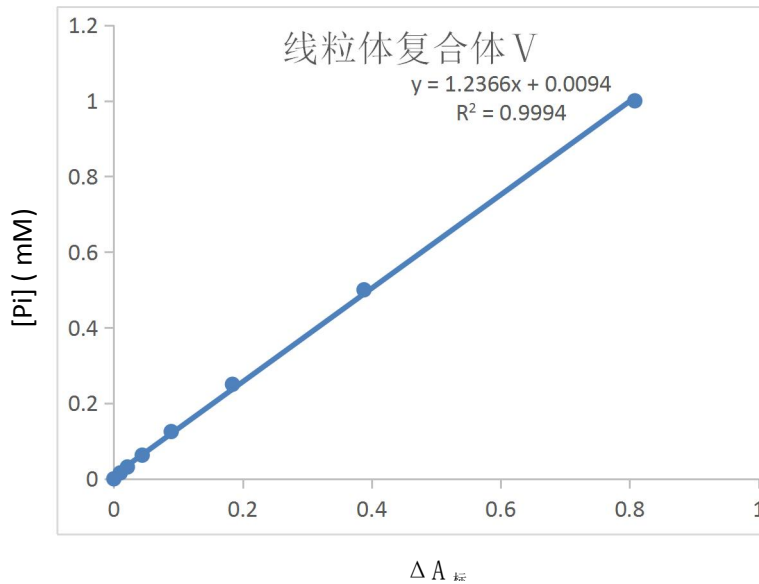
样本线粒体呼吸链复合体 V 总活性即为上清中线粒体呼吸链复合体 V 活性与沉淀中线粒体呼吸链复合体 V 活性之和。

$$\text{按细胞数量计算：线粒体呼吸链复合体 V 总活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = 0.135 \times y_{\text{上清}} + 0.108 \times y_{\text{沉淀}}$$

$V_{\text{酶促}}$ ：酶促反应体系总体积， $1 \times 10^{-4}$ L； $10^6$ ：单位换算系数， $1\text{mmol} = 10^6\text{nmol}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.05mL；T：反应时间，30min； $V_{\text{提取}}$ ：提取体系体积，1.01mL；W：样本重量，g； $V_{\text{重悬}}$ ：重悬沉淀体积，0.808mL；500：细胞总数，500 万。

### 结果展示

典型标准曲线—以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



### 注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

### 相关产品：

- PMK1100 线粒体呼吸链复合体 I /NADH-辅酶 Q 还原酶检测试剂盒（微量法）
- PMK1101 线粒体呼吸链复合体 II /琥珀酸-辅酶 Q 还原酶检测试剂盒（微量法）
- PMK1102 线粒体呼吸链复合体 III /CoQ-细胞色素 C 还原酶检测试剂盒（微量法）
- PMK1103 线粒体呼吸链复合体 IV /细胞色素 C 氧化酶检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

