

线粒体呼吸链复合体 V 活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Chain Complex V Activity Assay Kit

可见分光光度法

货号: AK206

规格: 25T/12S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK206-A	25mL×1 瓶	-20℃保存;
AK206-B	25mL×1 瓶	-20℃保存;
AK206-C	1 mL×1 瓶	-20℃保存;
AK206-D	粉剂×1 支	20℃保存; 临用前加入 1.3mL 蒸馏水, 充分溶解备用, 剩余试剂仍-20℃保存;
AK206-E	6mL×1 瓶	4℃保存;
AK206-F	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用前加入 3mL 蒸馏水充分混匀; 4℃保存一周;
AK206-G	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用前加入 3mL 蒸馏水充分混匀; 4℃保存一周;
AK206-H	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用前加入 10mL 蒸馏水充分混匀; 4℃保存一周;
AK206-I	10mL×1 瓶	室温保存;
<p>定磷试剂的配制: 按 H₂O: AK206-G:H:I=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)。</p> <p>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。</p>		

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 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。

原理: 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。

自备用品:

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。

样品测定的前处理:

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 AK206-A 和 10uL AK206-C, 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 AK206-B 和 8uL AK206-C, 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: 在 EP 管中加入下列试剂

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)
AK206-D	50	50

AK206-E	200	200
样本		250
混匀, 37℃ (哺乳动物) 或25℃ (其它物种) 准确水浴30min		
AK206-F	100	100
样本	250	
混匀, 4000g, 25℃离心 10min, 取上清液待测		

2. 定磷, 在新的 EP 管中加入

上清液	250	250
定磷试剂	1250	1250
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 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

注意: 每个测定管设一个对照管。

复合体 V 活性计算:

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

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。

$$\text{复合体 V 活性 (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0361) \div 1.2487 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 64 \times (\Delta A - 0.0361) \div \text{Cpr}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

(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。

$$\text{复合体 V 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.0361) \div 1.2487 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 51.7 \times (\Delta A - 0.0361) \div W$$

(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。

$$\text{复合体 V 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A - 0.0361) \div 1.2487 \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 0.103 \times (\Delta A - 0.0361)$$

注: V 反总: 反应体系总体积, 6×10^{-4} L; V 样: 加入样本体积, 0.25 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。