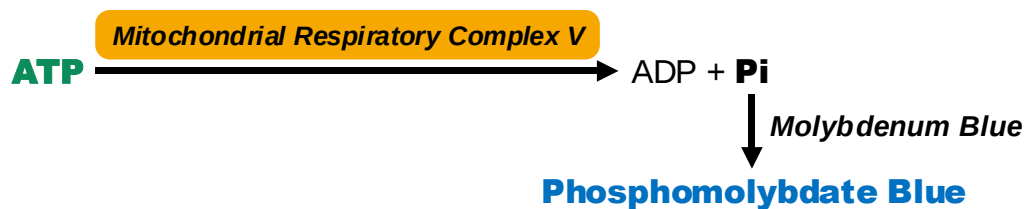




线粒体呼吸链复合体 V 活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Complex V Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



线粒体呼吸链复合体 V 活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Complex V Activity Assay Kit

一、产品描述

线粒体呼吸链复合体V由 F_1 和 F_0 两个亚单位组成又称 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，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，能够利用呼吸链产生的质子电化学梯度催化 ATP 合成，也可通过可逆反应水解 ATP。线粒体呼吸链复合体V活性的测定对呼吸电子传递链（ETC）和活性氧（ROS）生成状态分析具有重要意义。

线粒体呼吸链复合体V可催化 ATP 水解生成 ADP 和无机磷，无机磷在酸性条件下能够与钼酸铵反应生成磷钼酸铵，经还原后生成蓝色磷钼蓝，产物在 660 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征线粒体呼吸链复合体V的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液 A	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存	-
提取液 B	液体 10 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂一	粉剂×1 支	-20°C保存	使用前加入 1.5 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月，避免反复冻融)
试剂二	液体 5 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂三	液体 3 mL×1 瓶	4°C避光保存	-
试剂四	粉剂×1 瓶	4°C避光保存	使用前加入 6 mL 蒸馏水充分溶解 (配制后-20°C可保存一个月)
试剂五	粉剂×1 瓶	4°C保存	使用前加入 6 mL 蒸馏水充分溶解 (配制后 4°C可保存一个月)
试剂六	液体 6 mL×1 瓶	4°C保存	-
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C保存	10 μ mol/mL 磷标准液
标准应用液的制备（现用现配）：将 10 μ mol/mL 磷标准液使用蒸馏水稀释 40 倍至 0.25 μ mol/mL 即为标准应用液。			

定磷剂的配制（现用现配）：根据使用量按试剂四：试剂五：试剂六：蒸馏水=1:1:1:2的体积比配制，定磷剂正常应为浅黄色，若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染。

注意：测定所用器皿要求严格无磷，最好使用新的玻璃器皿或一次性塑料器皿，避免磷污染。

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿（光径 10 mm、狭缝 3 mm、体积 1.05 mL）、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①称取 100 mg 组织或收集 500 万细胞，加入 1 mL 提取液 A，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，匀浆液 4℃ 600 g 离心 10 min，弃沉淀，取上清；

②吸取步骤①离心后上清液至另一离心管中，4℃ 12000 g 离心 10 min；

③步骤②离心后上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的复合体 V（此步可选做）；

④步骤②离心后沉淀中加入 600 μL 提取液 B，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 5 s，间隔 10 s，重复 15 次）即为**粗酶液**，用于线粒体复合体 V 活性测定（可用于蛋白含量测定）。

2.测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 660 nm，蒸馏水调零。

②在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
试剂一	40	40	-	-
试剂二	160	160	-	-
粗酶液	200	-	-	-
37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确反应 30 min				
试剂三	80	80	-	-
粗酶液	-	200	-	-
充分混匀，8000 g 常温离心 10 min，取上清液				
上清液	200	200	-	-
标准应用液	-	-	200	-
蒸馏水	-	-	-	200
定磷剂	1000	1000	1000	1000
充分混匀，40℃显色 10 min，冷却至室温				

吸光值测定：吸取 1 mL 反应液至 1 mL 玻璃比色皿中，测定 660 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。注：每个样本均需设一个对照管，标准管和空白管只需测定 1-2 次。

3. 线粒体呼吸链复合体 V 活性计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体 V (U/mg prot)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{酶促}} \times 10^3}{\Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}} \times T} = \frac{20 \times \Delta A_{\text{测定}}}{C_{\text{pr}} \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

注释： C 标：标准应用液浓度，0.25 $\mu\text{mol/mL}$ ；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.2 mL；V 酶促：酶促反应总体积，0.48 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，30 min； 10^3 ：单位换算系数，1 $\mu\text{mol}=1000 \text{ nmol}$ 。

四、注意事项

- ①测定所用器皿要求严格无磷，最好使用新的玻璃器皿或一次性塑料器皿，避免磷污染；
- ②提取液中含有约 1 mg/mL 蛋白，样本蛋白浓度测定后需减去提取液自身的蛋白含量；
- ③若 A 测定或 ΔA 测定大于 1.0，建议将粗酶液或离心上清液适当稀释后再进行测定；若 ΔA 测定小于 0.02，建议适当延长酶促反应时间或制备更高浓度样本后再进行测定，计算时相应修改；
- ④加入定磷剂可能会有絮凝现象产生，充分混匀后测定即可，并不影响测定结果；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系；
- ⑥推荐使用样本蛋白浓度计算活性，若使用样本质量计算，则需加测胞浆提取物活性，上清和沉淀酶活之和即为总酶活。

附：使用样本质量计算的公式

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{上清中复合体 V (U/g)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A1 \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{提 A}} \times 10^3}{\Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{20 \times \Delta A1}{W \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

$$\text{沉淀中复合体 V (U/g)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A2 \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{提 B}} \times 10^3}{\Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{12 \times \Delta A2}{W \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

$$\text{复合体 V (U/g)} = \text{上清中复合体 V} + \text{沉淀中复合体 V} = \frac{20 \times \Delta A1}{W \times \Delta A_{\text{标准}}} + \frac{12 \times \Delta A2}{W \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

注释： C 标：标准应用液浓度，0.25 $\mu\text{mol/mL}$ ；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.2 mL；V 酶促：酶促反应总体积，0.48 mL；V 提 A：提取过程中加入提取液 A 的体积，1 mL；V 提 B：提取过程中加入提取液 B 的体积，0.6 mL；W：样本质量，g；T：反应时间，30 min； 10^3 ：单位换算系数，1 $\mu\text{mol}=1000 \text{ nmol}$ ； $\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

