



# 线粒体呼吸链复合物 V 活性比色法定量检测试剂盒产品说明书

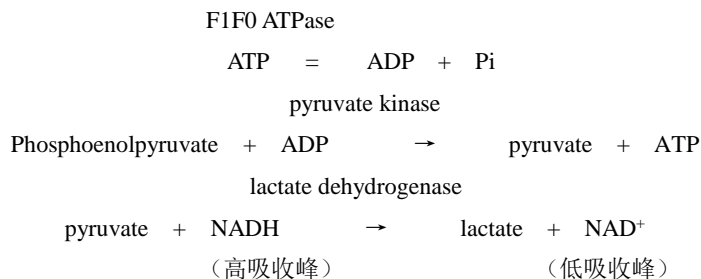
## (A089-5-1 20 管/10 样)

### 一、主要用途

线粒体呼吸链复合物 V（FOF1-ATP 酶/ATP 合成酶）活性光谱法定量检测试剂是一种旨在使用丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶连续循环法反应系统，测定与 ATP 合成对应的 ATP 水解产生 ADP 过程中，伴随的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）氧化后吸光峰值的降低，即采用光谱法测定样品中酶活性的权威而经典的技术方法。该技术经过精心研制、成功实验证明的。其适合于各种纯化线粒体样品（动物、人体、酵母）以及细胞或组织裂解悬液样品的 FOF1-ATP 酶/ATP 合成酶的特异性活性检测。可用于心肌、能量代谢、蛋白组学、病理生理学、神经病变等研究。产品不含污染性蛋白酶，严格无菌，即到即用，操作简捷，性能稳定，反应优化，检测敏感。

### 二、技术背景

线粒体呼吸链复合物V，通常称为ATP合成酶（ATP synthase）、F型ATP酶（F type ATPase）和F1F0 ATP酶（F1F0 ATPase），是线粒体氧化磷酸化的终极反应。其分子量为500KD，含有十六个亚单位，其中两个：ATP酶6和8为线粒体DNA编码的。ATP酶主要有两个结构域：F0为质子通道，由几个膜蛋白构成，包括a、b、c、d、e、F6、A6L、OSCP（oligomycin sensitive conferring protein）等；和F1催化活性结构域，由水溶性的 $\alpha$   $\beta$   $\beta$   $\gamma$   $\delta$   $\epsilon$  蛋白构成。其最特征性的酶活性是寡霉素敏感的ATP合成酶。复合物V的主要功能在于产生大部分细胞所需的能量ATP。ATP的合成需要线粒体内膜电子传递到氧分子时，呼吸链蛋白所产生的质子梯度变化。质子通过F0结构域传递到基质，激活F1催化活性结构域，促使ATP合成。该酶异常会导致心肌和神经系统疾病。基于ATP，在寡霉素参与下，受到F1F0 ATP酶的水解，进而通过丙酮酸激酶（pyruvate kinase；PK）和乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase；LDH）反应系统中，还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（reduced nicotinamide adenine dinucleotide；NADH）转化为氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide；NAD），产生的吸光峰值的变化（340nm），来定量分析F1F0 ATP酶活性。其反应系统为：





### 三、产品内容

缓冲液（Reagent A）	20 毫升
反应液（Reagent B）	2.5 毫升
阴性液（Reagent C）	2 毫升
底物液（Reagent D）	500 微升
专性液（Reagent E）	250 微升
产品说明书	1 份

### 四、保存方式

-20℃冰箱避光保存，避免反复冻融；反应液（Reagent B）避免光照，有效保证 6 月

### 五、用户自备

比色皿：用于比色分析的容器

双波长分光光度仪：用于比色分析

培养箱：用于孵育反应物

### 六、实验步骤

实验开始前，将-20℃冰箱里的试剂盒中的试剂溶液置入冰槽里融化；**反应液（Reagent B）**注意避光。然后进行下列操作。

#### （一）、测定准备

- 1、准备好待测样品（例如纯化线粒体样品等），置于冰槽里
- 2、设定好分光光度仪（温度为 30℃）：波长为 340nm，间隔 30 秒，读数 11 次（共 5 分钟），并置零
- 3、**缓冲液（Reagent A）**室温下均衡温度

#### （二）、背景对照测定

- 1、移取 780 微升**缓冲液（Reagent A）**到新的比色皿
- 2、加入 100 微升**反应液（Reagent B）**
- 3、加入 20 微升**底物液（Reagent D）**
- 4、放进 30℃培养箱里静置 3 分钟
- 5、加入 100 微升**阴性液（Reagent C）**
- 6、上下颠倒数次，混匀（限定在 3 秒之内）
- 7、即刻放进分光光度仪检测，此为背景空对照：  
**340 波长读数 0 分钟 - 340 波长读数 1 分钟或 5 分钟**

#### （三）、样品总活性测定

- 1、移取 780 微升**缓冲液（Reagent A）**到新的比色皿
- 2、加入 100 微升**反应液（Reagent B）**
- 3、加入 20 微升**底物液（Reagent D）**



- 4、放进 30℃培养箱里静置 3 分钟
- 5、加入 100 微升待测样品（注意：**10 微克总线粒体蛋白**）
- 6、上下倾倒数次，混匀（限定在 3 秒之内）
- 7、即刻放进分光光度仪检测，此为样品总活性读数：  
**340 波长读数 0 分钟 - 340 波长读数 1 分钟或 5 分钟**

#### （四）、样品非特异活性测定

实验开始前，移取 100 微升待测样品（注意：**10 微克总线粒体蛋白**）到 1.5 毫升离心管，加入 20 微升**专性液（Reagent E）**，混匀后，放进 30℃培养箱里孵育 15 分钟。然后置于冰槽里备用

- 1、移取 760 微升**缓冲液（Reagent A）**到新的比色皿
- 2、加入 100 微升**反应液（Reagent B）**
- 3、加入 20 微升**底物液（Reagent D）**
- 4、放进 30℃培养箱里静置 3 分钟
- 5、加入 120 微升上述预处理的待测样品
- 6、上下倾倒数次，混匀（限定在 3 秒之内）
- 7、即刻放进分光光度仪检测，此为样品非特异活性读数：  
**340 波长读数 0 分钟 - 340 波长读数 1 分钟或 5 分钟**

#### （五）、计算样品活性

##### （1）、样品活性（总活性或非特异活性）

$$\frac{(\text{样本读数} - \text{背景读数}) \times \text{体系容量} (1\text{ml}) \times \text{样本稀释倍数}}{\text{样本容量} (0.1\text{ml}) \times 6.22 (\text{毫摩尔吸光系数}) \times \text{反应时间} (1 \text{ 或者 } 5 \text{ 分钟})} \div \text{样本蛋白浓度} (\text{mgprot/ml})$$

单位：μ mol NADH/min/mgprot

##### （2）、样品特异活性

样品总活性 - 样品非特异活性 = 样品特异活性

#### 七、注意事项

- 1、本产品为 21 次（10 个样本）操作，包括背景对照测定
- 2、操作时，须戴手套
- 3、系统操作过程中，背景测定只需 1 次
- 4、线粒体样品检测前，须溶解；建议冻存融解（-70℃至 37℃）循环 3 次
- 5、如果增强酶活检测，建议使用线粒体复合物待测样品预处理试剂盒
- 6、加入样品启动反应后 3 秒内即刻比色测定
- 7、建议线粒体悬液使用 0.25 M SUCROSE 和 2 mM EDTA，pH9.0；忌用磷酸缓冲溶液
- 8、通常反应 1 分钟后比色测定值趋于稳定；测定值由高到低变化；测定可以持续 5 分钟



- 9、测定值由高到低变化，即 0 分钟测定读数高于 1 分钟或 5 分钟测定读数，表明有酶活性
- 10、比色测定后，比色皿须清洗彻底
- 11、建议使用线粒体裂解悬液，而不是细胞裂解悬液。如果使用细胞裂解悬液，第一须澄清；第二须加 50 微克
- 12、建议待测样本线粒体蛋白浓度为 10 微克/100 微升；如果样本酶活性过低或过高，则可以增加或降低样本量；注意计算公式的调整（本公司提供线粒体溶解试剂盒为后续线粒体蛋白浓度测定的预处理试剂盒和 Bradford 蛋白质浓度定量试剂盒）
- 13、样品特异活性是指寡霉素敏感的 ATP 合成酶，去除其它干扰因素（例如复合物 I/II/III/IV 等）
- 14、线粒体呼吸链复合物 V 酶活性单位浓度定义：在 30℃ 温度下，pH 7.5 条件下，每分钟内能够氧化 1 微摩尔还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）所需的酶量作为一个活性单位
- 15、本公司提供系列线粒体及其酶类技术产品

## 八、质量标准

本产品经鉴定性能稳定

本产品经鉴定检测准确