

线粒体呼吸链复合物 V 活性测试盒

20 管/10 样

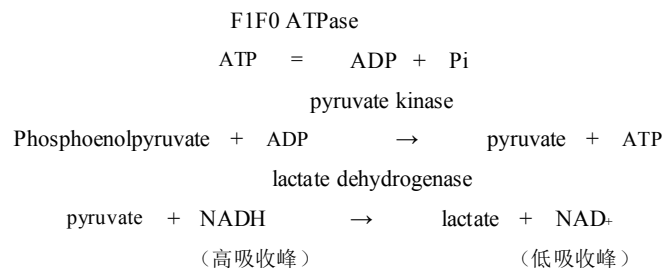
一、反应原理:

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

α 3 β 3 γ δ ϵ 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：



二、试剂组成:

| | |
|-----------------|--------|
| 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 |
| 专性液 (Reagent E) | 250 微升 |
| 产品说明书 | 1 份 |

三、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。

四、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

五、实验步骤:

(一)、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

(二)、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

(三)、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

六、样品活性计算:

- (1)、样品活性 (总活性或非特异活性)

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

(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

(蛋白浓度可通过总蛋白定量考马斯亮蓝法试剂盒测定)