

线粒体复合体V/ATP合成酶试剂盒(磷钼酸比色法) (微板法)

产品货号: BA2835

产品规格: 48样

产品简介:

线粒体呼吸链复合体V, 通常称为ATP合成酶(ATP synthase)、F型ATP酶(F type ATPase)和FIFOATP酶(F1FOATPase), 是线粒体氧化磷酸化的终极反应。复合物V的主要功能在于产生大部分细胞所需要的能量ATP也可逆过程水解ATP。在动物中该酶异常会导致心肌和神经系统疾病。

利用线粒体呼吸链复合体V可水解ATP产生ADP和Pi的功能, 通过测定Pi增加速率来测定线粒体复合体V的酶活性大小。

产品内容:

| 产品名称 | 规格 | 保存条件 | 备注 |
|------|---------------------------|-------|--|
| 试剂一 | 液体60mL×1瓶 | 2-8°C | |
| 试剂二 | 液体10mL×1瓶 | 2-8°C | |
| 试剂三 | 液体0.3mL×1支 | 2-8°C | |
| 试剂四 | 液体16mL×1瓶 | 2-8°C | |
| 试剂五 | 粉剂×1支 | 2-8°C | 临用前甩几下使粉末全部落入试管底部, 加入2.2mL蒸馏水, 混匀备用。 |
| 试剂六 | 液体10mL×1瓶 | 2-8°C | |
| 试剂七 | A: 粉剂mg×1瓶 B: 液体2mL×1瓶 | 2-8°C | 临用前在试剂A中加1.8mL的B液, 再加23.2mL的蒸馏水, 混匀溶解备用。 |
| 标准品 | 粉剂mg×1支 | 2-8°C | 若重新做标曲, 则用到该试剂。 |

【注】: 全程需无磷环境: 试剂配置最好用新枪头和玻璃移液器等, 也可用一次性塑料器皿, 避免磷污染。

所需的仪器和用品:

酶标仪、96孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

线粒体复合体V活性检测:

建议正式实验前选取2个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1. 线粒体制备(提示: 整个线粒体的提取过程须保持4°C低温环境):

- (1) 称取约0.1g组织或收集500万细菌/细胞, 加入1mL试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于4°C×700g离心10min(若漂浮有脂肪, 可用枪头去除)。
- (2) 弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4°C×12000g离心10min。沉淀即为提取的线粒体, 用作第④步操作。
- (3) (选做)上步得到的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, 用于判断线粒体提取效果。
- (4) 在沉淀(线粒体)中加入200μL试剂二和2μL试剂三, 超声波破碎(冰浴, 功率20%或200W, 超声3s, 间隔10秒, 重复30次), 液体置于冰上用于线粒体复合体V酶活性测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1:5~10的比例进行提取, 或按照细菌/细胞数量(10⁴):提取液(mL)为500~1000:1的比例进行提取。

2. 上机检测:

- (1) 酶标仪预热30min以上, 调节波长至700nm, 所有试剂解冻至室温(25°C)。
- (2) 将试剂四和五和六置于37°C(哺乳动物)或25°C(其它物种)于恒温振荡培养箱或水浴锅中孵育15min; 在EP管中依次加入:

| 试剂名称(μL) | 测定管 | 对照管 |
|----------|-----|-----|
| 试剂四 | 160 | 160 |



扫一扫 加微信

上海尚宝生物技术有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>

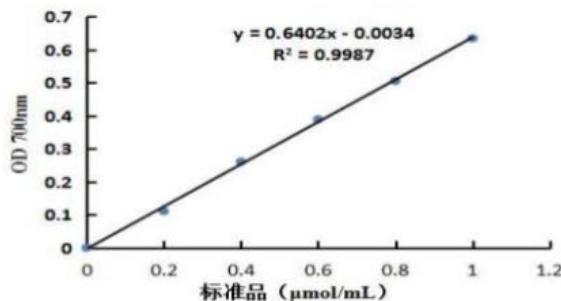
| | | |
|--|-----|-----|
| 样本 | 20 | |
| 试剂五 | 20 | 20 |
| 混匀后置于37°C (哺乳动物) 或25°C (其它物种)，准确反应30min。 | | |
| 试剂六 | 100 | 100 |
| 样本 | | 20 |
| 混匀，12000rpm，4°C离心5min，上清液待测。 | | |

(3) 显色反应，在96板中加入：

| | | |
|--|-----|-----|
| 上清液 | 50 | 50 |
| 试剂七 | 200 | 200 |
| 混匀，室温静置3min，700nm下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。 | | |

结果计算：

1. 标准曲线方程： $y = 0.6402x - 0.0034$ ，x是标准品摩尔质量($\mu\text{mol/mL}$)，y是 ΔA 。



2. 按蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白分解 ATP 产 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

复合体 V 活性($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$)=[($\Delta A + 0.0034$) $\div 0.6402 \times V_2$] $\div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T = 46.86 \times (\Delta A + 0.0034) \div C_{\text{pr}}$

3. 按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

复合体 V 活性($\mu\text{mol}/\text{h/g 鲜重}$)=[($\Delta A + 0.0034$) $\div 0.6402 \times V_2$] $\div (W \times V_1 \div V) \div T = 9.47 \times (\Delta A + 0.0034) \div W$

4. 按细菌或细胞密度计算：

定义：每小时每 1 万个细菌或细胞分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

复合体 V 活性($\mu\text{mol}/10^4 \text{cell}$)=[($\Delta A + 0.0034$) $\div 0.6402 \times V_2$] $\div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.02 \times (\Delta A + 0.0034)$

V---提取液体积，0.202mL；V1---样本体积，0.02mL；V2---酶促反应总体积，0.3mL；T---反应时间，1/2 小时；W---样本鲜重，g；500---细菌或细胞总数，万；Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 制备标准品母液(5 $\mu\text{mol/mL}$)：标准品用 10mL 试剂一溶解。(母液需在两天内用)。
- 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{mol/mL}$ 。
- 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物技术有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>