

线粒体复合体V/ATP合成酶(合成作用)试剂盒(紫外法)

产品货号: BA3394

产品规格: 24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F1F0ATP酶(F1F0ATPase), 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。在动物中该酶异常会导致心肌和神经系统疾病。

线粒体呼吸链复合体V(F1F0ATP酶)催化ADP和Pi反应生成ATP, 通过己糖激酶和磷酸葡萄糖脱氢酶的相继作用, 伴随着NADP+还原成NADPH, 通过检测340nm处NADPH的增加速率即可得出线粒体复合体V合成ATP的酶活性大小。

产品内容:

产品名称	规格	保存条件	注意事项
试剂一	液体30mL×1瓶	2-8℃	
试剂二	液体5mL×1瓶	-20℃	
试剂三	液体1支	-20℃, 避光	
试剂四	粉剂1支	-20℃, 避光	1. 临用前8000g 4℃离心2min使试剂落入管底; 2. 加入1.8mL蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉剂1支	-20℃	1. 临用前8000g 4℃离心2min使试剂落入管底; 2. 加入1.8mL蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂六	粉剂1支	-20℃	1. 临用前8000g 4℃离心2min使试剂落入管底; 2. 加入1.7mL蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂七	液体27mL×1瓶	2-8℃	
试剂八	粉剂1支	2-8℃	1. 临用前8000g 4℃离心2min使试剂落入管底; 2. 加入1.1mL蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

指标测定:

建议先选取1-3个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1. 线粒体制备(提示: 整个线粒体的提取过程须保持4℃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℃×700g离心10min。
- ②弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4℃×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,



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
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

QQ: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

用于判断线粒体提取效果。

④ 在沉淀（线粒体）中加入 200 μ L 试剂二和 2 μ L 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（ 10^4 ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2. 检测步骤：

① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

② 将下表体系用到的所有试剂置于 37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或 25 $^{\circ}$ C（其它物种）于恒温振荡培养箱或水浴锅中孵育 15min；在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（ μ L）	测定管	对照管
样本	60	60
试剂四	30	30
试剂五	30	30
试剂六	30	30
试剂七	520	520
混匀，置于 37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或 25 $^{\circ}$ C（其它物种）下孵育 10min。		
试剂八	30	
试剂七		30
混匀，立即于 340nm 处读取各管 A1，置于 37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或 25 $^{\circ}$ C（其它物种），15min 后读取 A2， $\Delta A = (A2 - A1)$ 测定 - (A2 - A1) 对照（每个样本做一个自身对照）。		

【注】 1.若 ΔA 的值在零附近徘徊，可以增加样本加样体积（如 100 μ L，试剂七相应减少），或延长反应时间（如增至 10min），则改变后的加样体积 V1 或反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

结果计算：

1. 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

复合体 V 活性（nmol/min /mg prot）= $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 125.1 \times \Delta A \div Cpr$

2. 按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

复合体 V 活性（nmol/min /g 鲜重）= $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 25.3 \times \Delta A \div W$

3. 按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

复合体 V 活性（nmol/min / 10^4 cell）= $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.05 \times \Delta A$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d---光径，1cm； V---加入提取液体积，0.202mL；

V1---加入样本体积，0.06mL； V2---反应体系总体积， 7×10^{-4} L； T---反应时间，15min； W---样本质量，g；

500---细胞或细菌总数，500 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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 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