

## 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<sup>+</sup>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, 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

【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℃（哺乳动物）或 25℃（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（μL）	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℃（哺乳动物）或 25℃（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℃（哺乳动物）或 25℃（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  $\Delta A$  的值在零附近徘徊，可以增加样本加样体积（如 100μL，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）= $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.05 \times \Delta A$

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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， $7 \times 10^{-4}$  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

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com