

# 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°C	
试剂二	液体5mL×1瓶	-20°C	
试剂三	液体1支	-20°C, 避光	
试剂四	粉剂1支	-20°C, 避光	1. 临用前8000g 4°C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°C	1. 临用前8000g 4°C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°C	1. 临用前8000g 4°C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°C	
试剂八	粉剂1支	2-8°C	1. 临用前8000g 4°C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°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。
- 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。



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

扫一扫 加微信

**【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<sup>4</sup>)：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°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°C(哺乳动物)或25°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°C(哺乳动物)或25°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 $\Delta A$ 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) =  $[\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 125.1 \times \Delta A \div Cpr$

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) =  $[\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 25.3 \times \Delta A \div W$

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<sup>4</sup> cell) =  $[\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.05 \times \Delta A$

$\varepsilon$ --NADPH摩尔消光系数，6.22×10<sup>3</sup>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<sup>-4</sup>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。



**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

扫一扫 加微信