



线粒体复合体V/ATP合成酶试剂盒(磷钼酸比色法)

可见分光光度法

货号: R45016-24S

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F1FOATP酶(F1F0ATPase), 是线粒体氧化磷酸化的终极反应。复合体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。

试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂	液体30mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	液体6mL×1瓶	4℃保存	
试剂三	液体0.2mL×1支	4℃保存	
试剂四	液体8mL×1瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×1支	4℃保存	临用前甩几下使粉末全部落入试管底部, 加入1.2mL蒸馏水, 混匀备用。
试剂六	液体5mL×1瓶	4℃保存	
试剂七	A:粉体mg×1瓶 B:液体3mL×1瓶	4℃保存	临用前在试剂A中加2.9mL的B液, 再加37.1mL的蒸馏水, 混匀溶解备用。
标准品	粉体mg×1支	4℃保存	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:

可见分光光度计、1mL玻璃比色皿(光径1cm)、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℃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 (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℃×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200 μL 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(10^4):提取液 (mL) 为500~1000:1的比例进行提取。

2、上机检测:

①可见分光光度计预热30min 以上, 调节波长至700nm, 蒸馏水调零。

②将试剂四和五和六置于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 EP 管中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管	对照管
试剂四	160	160
样本	20	
试剂五	20	20
混匀后置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种), 准确反应30min		
试剂六	100	100
样本		20
混匀, 12000rpm, 4℃离心5min, 上清液待测		

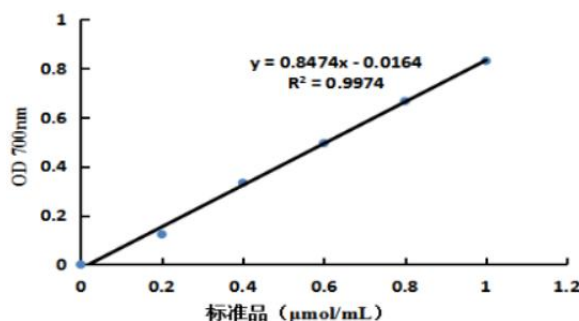


③ 显色反应，在 1mL 玻璃比色皿(光径1cm) 中加入：

上清液	150	150
试剂七	600	600
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： $y = 0.8474x - 0.0164$ ；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 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{复合体 V 活性}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V_2] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 35.4 \times (\Delta A + 0.0164) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织分解ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{复合体 V 活性}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 7.15 \times (\Delta A + 0.0164) \div W\end{aligned}$$

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 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{复合体 V 活性}(\mu\text{mol/h}/10^4\text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \\ &= 0.014 \times (\Delta A + 0.0164)\end{aligned}$$



V---提取液体积, 0.202 mL;

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;

50---细菌或细胞总数, 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。

附: 标准曲线制作过程:

- 1.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)。
- 2.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. $\mu\text{mol/mL}$ 。
- 3.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。

源叶