



线粒体复合体V/ATP合成酶(合成作用)试剂盒

可见分光光度法

货号: R45017-24S

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。

试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体30mL×1瓶	-20℃保存	
试剂二	液体5mL×1瓶	-20℃保存	
试剂三	液体μL×1支	-20℃保存	
试剂四	粉剂×1支	4℃保存;	前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加1.8mL蒸馏水溶解备用。
试剂五	粉剂×1支	-20℃保存	前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加1.8mL蒸馏水溶解备用。
试剂六	粉剂×1支	-20℃保存	前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加1.7mL蒸馏水溶解备用。
试剂七	液体27mL×1瓶	4℃保存	
试剂八	粉剂×1支	4℃保存;	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加1.1mL蒸馏水溶解备用。

所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(光径1cm)、 可调式移液器、低温台式离心机、 研钵、冰和蒸馏水。



线粒体复合体V活性测定:

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。

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:

试剂名称(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)。

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。

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

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。

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

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。

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

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

d---光径, 1cm;

V--- 加入提取液体积, 0.202 mL

V1----加入样本体积, 0.06mL;

V2--- 反应体系总体积, $7 \times 10^{-4} \text{ L}$;

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。