

## 线粒体复合体V/ATP合成酶试剂盒(磷钼酸比色法)（微板法）

产品货号：BA2835

产品规格：48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F<sub>1</sub>FOATP酶(F<sub>1</sub>FOATPase)，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P<sub>i</sub>的功能，通过测定P<sub>i</sub>增加速率来测定线粒体复合体V的酶活性大小。

产品内容：

| 产品名称 | 规格                      | 保存条件 | 备注                                     |
|------|-------------------------|------|----------------------------------------|
| 试剂一  | 液体60mL×1瓶               | 2-8℃ |                                        |
| 试剂二  | 液体10mL×1瓶               | 2-8℃ |                                        |
| 试剂三  | 液体0.3mL×1支              | 2-8℃ |                                        |
| 试剂四  | 液体16mL×1瓶               | 2-8℃ |                                        |
| 试剂五  | 粉剂×1支                   | 2-8℃ | 临用前甩几下使粉末全部落入试管底部，加入2.2mL蒸馏水，混匀备用。     |
| 试剂六  | 液体10mL×1瓶               | 2-8℃ |                                        |
| 试剂七  | A：粉剂mg×1瓶<br>B：液体2mL×1瓶 | 2-8℃ | 临用前在试剂A中加1.8mL的B液，再加23.2mL的蒸馏水，混匀溶解备用。 |
| 标准品  | 粉剂mg×1支                 | 2-8℃ | 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：

酶标仪、96孔板、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！

- 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)：
  - 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)。
  - 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。
  - (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。
  - 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。

【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. 上机检测：

- 酶标仪预热30min以上，调节波长至700nm，所有试剂解冻至室温(25℃)。
- 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  |     |



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

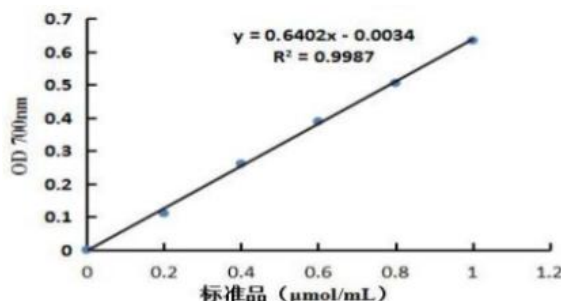
|                                     |     |     |
|-------------------------------------|-----|-----|
| 试剂五                                 | 20  | 20  |
| 混匀后置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种），准确反应30min。 |     |     |
| 试剂六                                 | 100 | 100 |
| 样本                                  |     | 20  |
| 混匀，12000rpm，4℃离心5min，上清液待测。         |     |     |

(3) 显色反应，在96板中加入：

|                                                                                      |     |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 上清液                                                                                  | 50  | 50  |
| 试剂七                                                                                  | 200 | 200 |
| 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： $y = 0.6402x - 0.0034$ ，x是标准品摩尔质量( $\mu\text{mol/mL}$ )，y是 $\Delta A$ 。



2. 按蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白分解 ATP 产  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

复合体 V 活性( $\mu\text{mol/mg prot}$ )= $[(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T = 46.86 \times (\Delta A + 0.0034) \div Cpr$

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。

复合体 V 活性( $\mu\text{mol/h/g}$  鲜重)= $[(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 9.47 \times (\Delta A + 0.0034) \div W$

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。

复合体 V 活性( $\mu\text{mol}/10^4\text{cell}$ )= $[(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.02 \times (\Delta A + 0.0034)$

V---提取液体积，0.202mL；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；500---细菌或细胞总数，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、1.0 $\mu\text{mol/mL}$ 。
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。



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