

线粒体复合体V/ATP合成酶(合成作用)试剂盒(微板法)

产品货号: BA3393

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60mL×1瓶	2-8℃	
试剂二	液体10mL×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1.1mL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1.1mL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1.1mL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18mL×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)、96孔板、离心管、酶标仪、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 200 μL 试剂二和 2 μL 试剂三, 超声波破碎(冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声



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

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. 检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

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;

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂四	10	10
试剂五	10	10
试剂六	10	10
试剂七	140	140
混匀, 置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 下孵育 10min。		
试剂八	10	
试剂七		10
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 ΔA 的值在零附近徘徊, 可以增加样本加样体积 (如 40μL, 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) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 214.4 \times \Delta A \div Cpr$

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) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 43.4 \times \Delta A \div W$

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) = $[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.087 \times \Delta A$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d---96 孔板光径, 0.5cm; V---加入提取液体积, 0.202mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL; V2---反应体系总体积, 2×10^{-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