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2mim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2mim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2mim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2mim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°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℃×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。

扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com

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。

【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℃（哺乳动物）或 25℃（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℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种），15min 后读取 A2，ΔA=（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）=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(V1×Cpr)÷T=214.4× ΔA ÷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）=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(W× V1÷V)÷T=43.4× ΔA ÷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）=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(500×V1÷V)÷T=0.087×ΔA

ε---NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^3L/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
上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号
电话：400-611-0007 13671551480
Q Q：807961520
邮箱：saintbio@126.com
http://www.saint-bio.com