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）

产品货号：BA2834

产品规格：24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FIFOATP酶(F1FOATPase)，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。

产品内容：

产品名称	规格	保存条件	备注
试剂一	液体30mL×1瓶	2-8℃	
试剂二	液体6mL×1瓶	2-8℃	
试剂三	液体0.2mL×1支	2-8℃	
试剂四	液体8mL×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1.2mL蒸馏水，混匀备用。
试剂六	液体5mL×1瓶	2-8℃	
试剂七	A：粉剂mg×1瓶 B：液体3mL×1瓶	2-8℃	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：

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. 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：

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

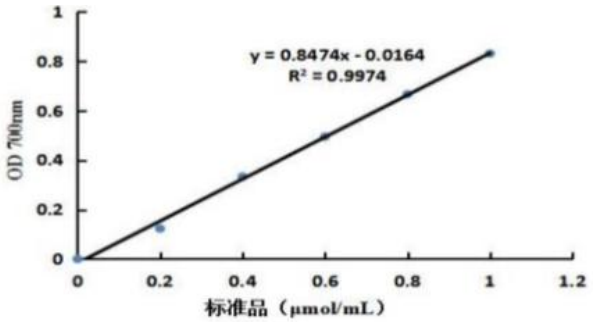
试剂名称(μL)	测定管	对照管
试剂四	160	160
样本	20	
试剂五	20	20
混匀后置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种），准确反应30min。		
试剂六	100	100
样本		20
混匀，12000rpm，4℃离心5min，上清液待测。		

(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，ΔA=A测定-A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(μmol/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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。
   复合体 V 活性(μmol/mg prot)=[(ΔA+0.0164)÷0.8474×V2]÷(V1×Cpr)÷T=35.4×(ΔA+0.0164)÷Cpr
3. 按样本鲜重计算：
   定义：每小时每克组织分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。
   复合体 V 活性(μmol/h/g 鲜重)=[(ΔA+0.0164)÷0.8474×V2]÷(W×V1÷V)÷T=7.15×(ΔA+0.0164)÷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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。
   复合体 V 活性(μmol//10^4cell)=[(ΔA+0.0164)÷0.8474×V2]÷(500×V1÷V)÷T=0.014×(ΔA+0.0164)
   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(5μmol/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. 0μmol/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。