

线粒体 H⁺-ATP 酶活性测定说明书 (货号: G0863W 微板法 48 样)

一、产品简介:

线粒体是细胞呼吸代谢的重要场所, 位于线粒体内膜的 H⁺-ATP 酶是氧化磷酸化偶联的关键组分。H⁺-ATP 酶可催化 ATP 水解生成 ADP 和无机磷, 本试剂盒通过测定无机磷的量来确定该酶活性高低。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液 1	提取液 60mL×1 瓶	4°C保存	
提取液 2	提取液 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 17mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×1 支	4°C保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 2.5mL 蒸馏水, 混匀溶解备用。
试剂三	液体 3mL×1 支	4°C保存	
试剂四	粉剂×1 支	4°C保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 2.5mL 蒸馏水, 混匀溶解备用。
试剂五	粉剂×1 支	-20°C保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.7mL 蒸馏水, 混匀溶解备用。
试剂六	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂七	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 1.5mL×1 瓶	4°C保存	临用前加 1.2 mL 的 B 液, 再加 15.47 mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

【注】: 全程操作需无磷环境; 试剂配置最好用新的枪头和玻璃移液器等, 也可以用一次性塑料器皿, 避免磷污染。

三、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。

四、线粒体 H⁺-ATP 酶活性检测:

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°C低温环境):

- ① 称取约 0.2g 组织或收集 1000 万细菌/细胞, 加入 1mL 提取液 1, 用冰浴匀浆器或研钵冰浴匀浆, 转移至离心管后于 4°C×3000g 离心 20min。
- ② 小心吸取上清液 (弃沉淀) 移至另一离心管中, 4°C×16000g 离心 20min。用移液器移除上清液 (上清液即为除去线粒体的胞浆蛋白, 可用于测定从线粒体泄漏的 H⁺-ATP 酶 (此步可选做))。留下沉淀 (沉淀即为线粒体)。
- ③ 在沉淀 (线粒体) 中加入 200μL 提取液 2, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 5s, 间隔 3s, 重复 30 次), 液体置于冰上用于线粒体 H⁺-ATP 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 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 740nm, 所有试剂解冻至室温 (25°C)。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 EP 管中依

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	140	150
试剂二	20	20
试剂三	30	30
试剂四	20	20
样本	40	40
混匀，静置 5min		
试剂五	10	
混匀，37℃孵育 20min		
试剂六	50	50
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测		

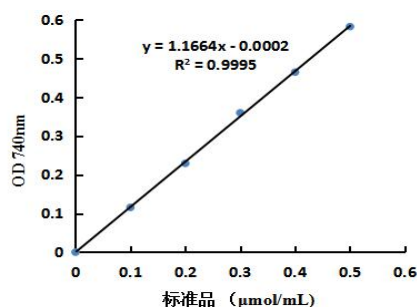
次加入：

④ 显色反应（在 96 孔板中操作）：

上清液	100	100
试剂七	150	150
混匀，室温静置 15min，740nm 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）。		

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 1.1664x - 0.0002$ ，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 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0002) \div 1.1664 \times V_2] \div (V_1 \times C_{pr}) \div T \\ &= 19.93 \times (\Delta A + 0.0002) \div C_{pr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0002) \div 1.1664 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 19.93 \times (\Delta A + 0.0002) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0002) \div 1.1664 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.04 \times (\Delta A + 0.0002)$$

5、液体中酶活力计算：

定义：每小时每毫升液体分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0002) \div 1.1664 \times V_2] \div V_1 \div T = 19.93 \times (\Delta A + 0.0002)$$

V---加入提取液体积, 1mL; V1---加入样本体积, 0.04mL ;
V2---酶促反应总体积, 0.31mL; T---反应时间, 1/3 小时;
W---样本鲜重, g; 500---细菌或细胞总数, 500 万;
Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的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 μ mol/mL)：标准品用 10mL 蒸馏水溶解。(母液需在两天内用)。
- 2 把母液稀释成九个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 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。