

线粒体 H⁺-ATP 酶活性测定说明书 (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°C）。

③ 在 EP 管中依次加入：

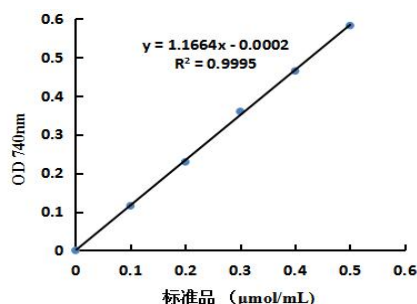
| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|-----------------------------|-----|-----|
| 试剂一 | 140 | 150 |
| 试剂二 | 20 | 20 |
| 试剂三 | 30 | 30 |
| 试剂四 | 20 | 20 |
| 样本 | 40 | 40 |
| 混匀，静置 5min | | |
| 试剂五 | 10 | |
| 混匀，37℃孵育 20min | | |
| 试剂六 | 50 | 50 |
| 混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测 | | |

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。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0002) \div 1.1664 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 19.93 \times (\Delta A + 0.0002) \div Cpr \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0002) \div 1.1664 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 19.93 \times (\Delta A + 0.0002) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0002) \div 1.1664 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.04 \times (\Delta A + 0.0002)$$

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。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0002) \div 1.1664 \times V2] \div V1 \div T = 19.93 \times (\Delta A + 0.0002)$$

V---加入提取液体积，1mL；
V2---酶促反应总体积，0.31mL；
W---样本鲜重，g；
Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；
T---反应时间，1/3 小时；
500---细菌或细胞总数，500 万；
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（50 μ mol/mL）：标准品用 1mL 蒸馏水溶解。（母液需在两天内用）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六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。