

线粒体 H⁺-ATP 酶活性测定说明书 (分光法 24 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 30mL×1 瓶	4°C 保存	
提取液 2	提取液 7mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 14mL×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 2mL 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 1.8mL 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 2mL×1 瓶	4°C 保存	临用前加 1.8 mL 的 B 液,再加 23.2 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:

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。

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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 740nm, 蒸馏水调零。
- 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	210	225
试剂二	30	30
试剂三	45	45
试剂四	30	30
样本	60	60
混匀，静置 5min		
试剂五	15	
混匀，37℃孵育 20min		
试剂六	75	75
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测		

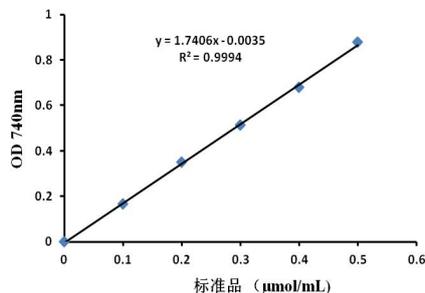
④ 显色反应，
加入：

上清液	300	300
试剂七	450	450
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）。		

在 EP 管中依次加入：

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 1.7406x - 0.0035$ ，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。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0035) \div 1.7406 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 13.36 \times (\Delta A + 0.0035) \div Cpr \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0035) \div 1.7406 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 13.36 \times (\Delta A + 0.0035) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0035) \div 1.7406 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.027 \times (\Delta A + 0.0035) \end{aligned}$$

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。

$$\text{酶活力 } (\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0035) \div 1.7406 \times V2] \div V1 \div T = 13.36 \times (\Delta A + 0.0035)$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.06mL ;

V2---酶促反应总体积, 0.465mL;

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 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 (50 $\mu\text{mol/mL}$): 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 $\mu\text{mol/mL}$ 。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。