

线粒体 H⁺-ATP 酶活性测定说明书

(货号: BP10486F 分光法 24 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液 1	提取液 30mL×1 瓶	4℃保存	
提取液 2	提取液 7mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 14mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 2mL 蒸馏水, 混匀溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 3mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂四	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.8mL 蒸馏水, 混匀溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 0.7mL 蒸馏水, 混匀溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂六	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂七	A:粉体 1 瓶 B:液体 3mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前加 2.86 mL 的 B 液, 再加 22.14 mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用; 2. 需避光, 现配现用, 变蓝色不能使用。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

【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、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)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、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℃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℃×3000g 离心 20min。
- ② 小心吸取上清液 (弃沉淀) 移至另一离心管中, 4℃×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、检测步骤：

- ① 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℃）。
- ③ 在 EP 管中依次加入：

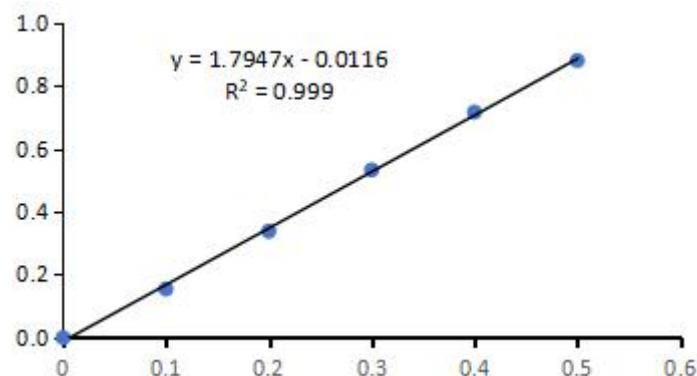
试剂组分（μL）	测定管	对照管
试剂一	210	225
试剂二	30	30
试剂三	45	45
试剂四	30	30
样本	60	60
混匀，静置 5min		
试剂五	15	
混匀，37℃孵育 20min		
试剂六	75	75
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测		

- ④ 显色反应，在 EP 管中依次加入：

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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 1.7947x - 0.0116$ ，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。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0116) \div 1.7947 \times V_2] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 12.95 \times (\Delta A + 0.0116) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

- 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。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0116) \div 1.7947 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T$$

$$= 12.95 \times (\Delta A + 0.0116) \div W$$

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 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0116) \div 1.7947 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T$$

$$= 0.026 \times (\Delta A + 0.0116)$$

5、液体中酶活力计算：

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

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0116) \div 1.7947 \times V_2] \div V_1 \div T = 12.95 \times (\Delta A + 0.0116)$$

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 标准品用 1mL 蒸馏水溶解。（母液需在两天内用），标准品母液浓度为 50 $\mu\text{mol/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母液 100 μL ，加入 900 μL 蒸馏水，混匀得到 5 $\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液；						
2. 吸取 5 $\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液 200 μL ，加入 1800 μL 蒸馏水，混匀得到 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 μL	0	80	160	240	320	400
水 μL	400	320	240	160	80	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	300	
蒸馏水		300
试剂七	450	450
混匀，室温静置 15min，740nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - 0 \text{ 浓度管}$ 。		