

## 线粒体 H<sup>+</sup>-ATP 酶活性测定说明书

(货号: ADS-W-A005 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<sup>+</sup>-ATP 酶是氧化磷酸化偶联的关键组分。

H<sup>+</sup>-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℃保存   |                                                                 |
| 提取液 2 | 提取液 15mL×1 瓶               | 4℃保存   |                                                                 |
| 试剂一   | 液体 17mL×1 瓶                | 4℃保存   |                                                                 |
| 试剂二   | 粉剂 1 支                     | 4℃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℃保存   |                                                                 |
| 试剂四   | 粉剂 1 支                     | 4℃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℃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℃保存   |                                                                 |
| 试剂七   | A:粉体 1 瓶<br>B:液体 1.5mL×1 瓶 | 4℃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。需避光, 现配现用, 变蓝色不能使用。 |
| 标准品   | 粉体 1 支                     | 4℃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<sup>+</sup>-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℃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<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-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 (10<sup>4</sup>): 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℃)。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

③ 在 EP 管中依次加

| 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°C 孵育 20min                |     |     |
| 试剂六                              | 50  | 50  |
| 混匀, 12000rpm, 4°C 离心 5min, 上清液待测 |     |     |

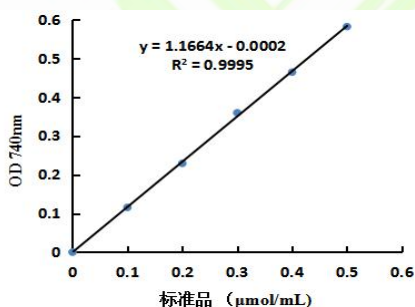
入:

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

## 五、结果计算:

1、标准曲线方程:  $y = 1.1664x - 0.0002$ ,  $x$  是标准品摩尔质量 ( $\mu\text{mol/mL}$ ),  $y$  是  $\Delta A$ 。



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  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

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

3、按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织分解 ATP 产生  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

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

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  $1\mu\text{mol}$  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  $1\mu\text{mol}$  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 (50 $\mu$ 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 $\mu$ 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。