

线粒体 H<sup>+</sup>-ATP 酶试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

## 测定意义：

线粒体 H<sup>+</sup>-ATP 酶的功能主要是合成 ATP 和转运 H<sup>+</sup>，在线粒体呼吸链中耦联 ATP 的合成，为机体提供能量。

## 测定原理：

H<sup>+</sup>-ATP 酶水解 ATP 产生 ADP 和无机磷，通过测定无机磷增加速率来测定 H<sup>+</sup>-ATP 酶活性。

## 需自备的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

## 试剂的组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂二：液体 25mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：液体 1.5mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂四：液体 20mL×1 瓶，4℃保存；

试剂五：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 6mL 蒸馏水，充分溶解待用。

试剂六：粉剂×1 支，-20℃保存；临用前加入 6mL 蒸馏水，充分溶解待用。

试剂七：液体 6mL×1 支，4℃保存。

试剂八：粉剂×1 支，4℃避光保存。临用前加 2mL 蒸馏水溶解。用不完的试剂 4℃保存。

试剂九：粉剂×3 支，4℃避光保存。临用前加 1mL 蒸馏水溶解。**现配现用。**

**定磷试剂的配制：**取 EP 管一支，加入 660μL 试剂七，再加入 100μL 试剂八，充分混匀后，再加入 240μL 试剂九，充分混匀待用。配好的定磷试剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染（请根据需要，用多少配多少，现配现用）。

**注意：**配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器，或者一次性塑料器皿，以避免磷污染。

## 样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

- 1、准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆 600g，4℃离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心 10min。
- 4、步骤 3 中的沉淀即为线粒体，加入 200μL 试剂二，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10 秒，重复 30 次），用于线粒体 H<sup>+</sup>-ATP 酶活性测定。

## 测定步骤：

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 660nm。

2、样本测定

在 EP 管中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定	对照
样本上清	50	50
试剂四	150	150
试剂五	50	

订购电话：0512-62956165 技术支持：18015581827 投诉电话：18112525205

蒸馏水		50
充分混匀, 37°C反应 30min		
试剂六	25	25
混匀, 8000g 4°C离心 5min, 取上清		

在 96 孔板中加入下列试剂

上清液	40	40
定磷试剂	20	20
蒸馏水	140	140

混匀, 静置 10min 后, 在 660nm 处读取 A 测定管和 A 对照管, 计算 $\Delta A = A$  测定管 - A 对照管。

### H<sup>+</sup>-ATP 酶活力单位的计算:

标准条件下测定的回归方程为  $y = 0.2373x - 0.0036$ ,  $R^2 = 0.9967$ ; x 为标准品浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ ), y 为 A 值。

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{H}^+\text{-ATP 酶活性 (nmol/min /mg prot)} &= (\Delta A + 0.0036) \div 0.2373 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \\ &= 772.58 \times (\Delta A + 0.0036) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{H}^+\text{-ATP 酶活性 (nmol/min /g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0036) \div 0.2373 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \times 1000 \\ &= 154.52 \times (\Delta A + 0.0036) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{H}^+\text{-ATP 酶活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0036) \div 0.2373 \times V \text{ 反总} \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ &\div T \times 1000 \\ &= 0.309 \times (\Delta A + 0.0036) \end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.275mL; V 样: 加入样本体积, 0.05 mL; V 样总: 加入提取液体积, 0.2 mL; T: 反应时间, 30 min; C<sub>pr</sub>: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。