

线粒体 H⁺-ATP 酶试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 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⁺-ATP 酶的功能主要是合成 ATP 和转运 H⁺，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⁺-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⁺-ATP 酶活性。

需自备的仪器和用品：

分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 15mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三：液体 1.5mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂四：液体 10mL×1 瓶，4℃保存；

试剂五：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 3mL 蒸馏水，充分溶解待用。

试剂六：粉剂×1 支，-20℃保存；临用前加入 3mL 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，弃上清，留沉淀，即为线粒体沉淀。
- 4、取步骤 3 中的线粒体沉淀，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⁺-ATP 酶活性测定。

测定步骤：

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 660nm，蒸馏水调零。

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	
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	200	200
定磷试剂	100	100
蒸馏水	700	700

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⁺-ATP 酶活力单位的计算:

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.4746x - 0.0036$, $R^2 = 0.9967$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 为 ΔA 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。

$$\begin{aligned} \text{H}^+\text{-ATP 酶活性 (nmol/min /mg prot)} &= (\Delta A + 0.0036) \div 0.4746 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times 1000 \\ &= 386.29 \times (\Delta A + 0.0036) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{H}^+\text{-ATP 酶活性 (nmol/min /g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0036) \div 0.4746 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 77.25 \times (\Delta A + 0.0036) \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{H}^+\text{-ATP 酶活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0036) \div 0.4746 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &\div T \times 1000 \\ &= 0.155 \times (\Delta A + 0.0036) \end{aligned}$$

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; Cpr: 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。