

线粒体 H^+ -ATP 酶活性测定试剂盒

分光法 24 样

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。

试剂盒组成和配制

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液 1	提取液 30mL×1 瓶		
提取液 2	提取液 7mL×1 瓶		
试剂一	液体 14mL×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 2mL 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 1.8mL 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 mg×1 瓶	4℃保存	临用前加 1.8 mL 的 B 液，再加 23.2mL 的蒸馏水，混匀溶解备用。
	B: 液体 2mL×1 瓶		
标准品	粉体 mg×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。

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。

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℃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、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℃)。

③ 在 EP 管中依次加入:

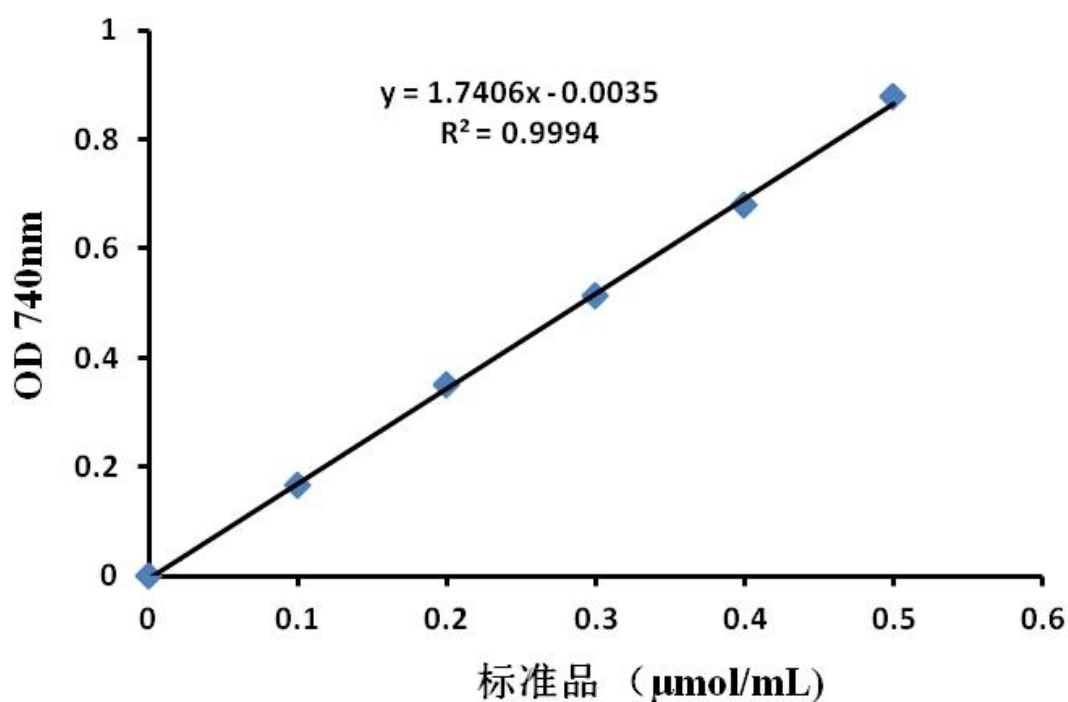
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	210	225
试剂二	30	30
试剂三	45	45
试剂四	30	30
样本	60	60
混匀, 静置 5min。		
试剂五	15	
混匀, 37℃孵育 20min。		
试剂六	75	75
混匀, 12000rpm, 4℃离心 5min, 上清液待测。		

④ 显色反应, 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)。		

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 ($\mu\text{mol/mL}$), 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 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

$= 13.36 \times (\Delta A + 0.0035) \div \text{Cpr}$ 。

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。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0035) \div 1.7406 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T$$

$$= 13.36 \times (\Delta A + 0.0035) \div W$$

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。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0035) \div 1.7406 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T$$

$$= 0.027 \times (\Delta A + 0.0035)$$

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。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0035) \div 1.7406 \times V_2] \div V_1 \div T = 13.36 \times (\Delta A + 0.0035)$$

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 (5 $\mu\text{mol/mL}$): 标准品用 10mL 蒸馏水溶解。(母液需在两天内用)。
2. 把母液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。