线粒体 H^+- ATP 酶活性测定说明书
（货号：BN72602 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^+-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 mg×1 瓶 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。
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。

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^+-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（10^4）：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 管中依次加入：

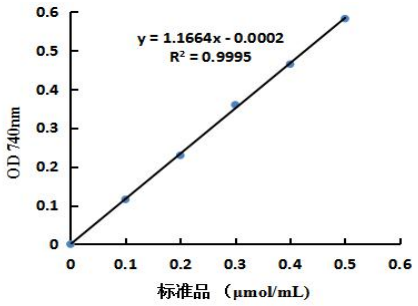
试剂名称（μL）	测定管	对照管
试剂一	140	150
试剂二	20	20
试剂三	30	30
试剂四	20	20
样本	40	40
混匀，静置 5min		
试剂五	10	
混匀，37℃孵育 20min		
试剂六	50	50
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测		

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，△A=A 测定-A 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（μmol/mL），y 是△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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力(μmol/h/mg prot)= [(△A+0.0002)÷1.1664×V2] ÷（V1×Cpr）÷T

=19.93×(△A+0.0002)÷Cpr

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。

酶活力(μmol/h/g 鲜重)=[(△A+0.0002)÷1.1664×V2]÷(W× V1÷V)÷T

=19.93×(△A+0.0002)÷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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力(μmol/h /10^4 cell)= [(△A+0.0002)÷1.1664×V2]÷(500×V1÷V)÷T=0.04×(△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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力（μmol/h/mL）=[(△A+0.0002)÷1.1664×V2]÷V1÷T=19.93×(△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（5μmol/mL）：标准品用 10mL 蒸馏水溶解。（母液需在两天内用）。
2　把母液稀释成九个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5μmol/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。