



H⁺-ATP 酶活性检测试剂盒

H⁺-ATPase Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



H⁺-ATP 酶活性检测试剂盒**H⁺-ATPase Activity Assay Kit****一、产品描述**

ATP 酶广泛分布于植物、动物、微生物和细胞的生物膜酶系统中，具有载体和酶的功能，可以维持细胞膜电位和调节渗透压，并为营养物质的吸收提供动力，对维持细胞正常生理功能起着极其重要的作用，并且可作为细胞能量代谢及功能有无损伤的重要评价指标。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 的合成成为机体提供能量。

H⁺-ATP 酶能够分解 ATP 生成 ADP 和无机磷，无机磷在酸性条件下能够与钼酸铵反应生成磷钼酸铵，经还原后生成蓝色磷钼蓝，产物在 660 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征 H⁺-ATP 酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	-20°C 保存	-
试剂二	液体 30 mL×1 瓶	-20°C 保存	-
试剂三	液体 1.5 mL×1 瓶	-20°C 避光保存	-
试剂四	液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂五	粉剂×1 瓶	-20°C 避光保存	使用前加入 4 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C 可保存 1 个月，避免反复冻融)
试剂六	粉剂×1 瓶	-20°C 避光保存	使用前加入 4 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C 可保存 1 个月，避免反复冻融)
试剂七	液体 2 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂八	粉剂×1 支	4°C 避光保存	使用前加入 2 mL 蒸馏水充分溶解 (配制后，4°C 可保存 1 个月)
试剂九	粉剂×3 支	-20°C 避光保存	使用前每支加入 0.5 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C 可保存 1 周，避免反复冻融)
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C 保存	10 μmol/mL 磷标准液
标准稀释液的制备（现用现配）：使用前将 10 μmol/mL 磷标准液使用蒸馏水稀释至 2.0、1.5、1.0、0.5、0.25、0.125 μmol/mL 即为标准稀释液，配制方法详见注意事项⑤。			

注：测定所用器皿要求严格无磷，最好使用新的玻璃器皿或一次性塑料器皿，避免磷污染。

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样品量及比例）

①称取 100 mg 组织或收集 500 万细胞，加入 1 mL 试剂一和 10 μ L 试剂三，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，4°C 600 g 离心 10 min，弃沉淀，取上清液；

②吸取步骤①离心后上清液至另一离心管中，4°C 12000 g 离心 10 min；

③步骤②离心后上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的 H^+ -ATP 酶（此步可选做）；

④步骤②离心后沉淀中加入 400 μ L 试剂二，冰浴超声破碎（功率 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次）即为粗酶液，用于线粒体 H^+ -ATP 酶活性测定。

2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 660 nm。

②定磷剂的制备（现用现配）：使用前根据使用量按试剂七：试剂八：试剂九=33:5:12的体积比配制，充分混匀即为定磷剂；定磷剂正常应为浅黄色，若无色则试剂失效，若蓝色则为磷污染。

③在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μ L)	对照组 (μ L)	标准组 (μ L)	空白组 (μ L)
粗酶液	50	50	-	-
标准稀释液	-	-	50	-
试剂四	150	150	150	150
试剂五	50	-	50	50
蒸馏水	-	50	-	50
充分混匀，37°C准确反应 30 min				
试剂六	25	25	25	25
充分混匀，4°C 8000 g 离心 5 min，取上清液				
在 96 孔板中依次加入下列试剂：				
上清液	40	40	40	40
定磷剂	20	20	20	20
蒸馏水	140	140	140	140
充分混匀，室温反应 10 min				

吸光值测定：测定 660 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照， ΔA 标准 = A 标准 - A 空白。注：每个样本均需设一个对照组，各浓度标准组和空白组只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 2.0、1.5、1.0、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{mol/mL}$ 为横坐标 (x)，以其对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y)，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定代入公式中得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

3. H^+ -ATPase 活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{H}^+\text{-ATPase (U/mg prot)} = \frac{x \times V_{\text{反总}} \times D \times 10^3}{C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{183.33 \times x \times D}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{H}^+\text{-ATPase (U/g)} = \frac{x \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times D \times 10^3}{W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{73.33 \times x \times D}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{H}^+\text{-ATPase (U/10}^4\text{ cell)} = \frac{x \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times D \times 10^3}{\text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{73.33 \times x \times D}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释：V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.05 mL；V 反总：反应体系总体积，0.275 mL；V 样总：粗酶液总体积，0.4 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计，若 500 万细菌或细胞则代入 500 即可；T：酶促反应时间，30 min；D：粗酶液稀释倍数，若未稀释则为 1； 10^3 ：换算系数， $1 \mu\text{mol}=10^3 \text{ nmol}$ 。

四、注意事项

①测定所用器皿要求严格无磷，最好使用新的玻璃器皿或一次性塑料器皿，避免磷污染；

②若 A 测定或 ΔA 测定超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将粗酶液使用**试剂二**适当稀释后再进行测定；低于最低值建议适当延长酶促反应时间（37°C 准确反应 30 min，可以延长至 90 min 以上）/制备更高浓度的样本后再进行测定，计算时相应修改；

③反应体系中试剂不能按比例配制为混合液使用，必须按反应体系顺序依次加入；

④试剂九配制后有效期短，为便于试验安排，附赠一支试剂九作为备用，每支均可完成至少 50 个样本的检测；

⑤**标准稀释液的制备（现用现配）**：使用前将 10 $\mu\text{mol/mL}$ 磷标准液使用蒸馏水稀释至 2.0、1.5、1.0、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{mol/mL}$ 即为标准稀释液；

序号	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	10	10	10	1.0	0.5	0.25
标准稀释液体积 (μL)	200	150	100	200	200	200
蒸馏水体积 (μL)	800	850	900	200	200	200
稀释后浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	2.0	1.5	1.0	0.5	0.25	0.125

⑥为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

Notes:

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

