



超微量 Ca²⁺-ATP 酶测试盒说明书(精简版)

(货号: A070-4 测红细胞)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、试剂组成与配制:

	组份	50 管/24 样 (A070-4-1)	100 管/48 样 (A070-4-2)	保存
试剂一	液体	4mL×1瓶	8mL×1瓶	4℃
试剂二	液体	2mL×1瓶	3mL×1瓶	4℃
试剂三	液体	2mL×1瓶	3mL×1瓶	4℃
试剂四	粉剂	粉剂×1支	粉剂×2支	-20℃
试剂四的配制: 用时每支试剂四粉剂加双蒸水5mL, 充分溶解。(用不完-20℃以下可保存一周。)				
试剂五	粉剂	粉剂×1支	粉剂×1支	4℃
试剂五的配制: 用时每支试剂五加双蒸水5mL, 适当加热溶解, 4℃可保存3个月。				
试剂六	粉剂	粉剂×1支	粉剂×1支	4℃
试剂六的配制: 用时每支试剂六加双蒸水10mL, 室温保存3个月。 [注]: 试剂六为过饱和溶液, 所以在配制时最好用90℃~100℃的热双蒸水10.3mL (热胀冷缩) 边隔水加热边用玻璃棒搅拌, 以使其充分溶解。一次实验用不完再用时可能有结晶, 用之前可以再次边隔水加热边玻璃棒搅拌使其溶解。				
试剂七	液体	3mL×1瓶	3mL×1瓶	4℃
试剂七的配制: 用时每瓶试剂七加双蒸水4.5mL, 4℃保存6个月。				
试剂八	10mmol/L 标准磷贮备液	5mL×1瓶	5mL×1瓶	4℃
试剂九 (定磷剂)	甲液	7mL×2瓶	7mL×4瓶	4℃
	乙液	6mL×2瓶	6mL×4瓶	4℃避光
[注]: 定磷剂乙液在冬天或4℃长时间保存时可能会出现凝胶状物质, 37℃溶解不了, 可将其60℃左右水浴10分钟即可完全溶解; 甲液、乙液应防止磷污染。				
试剂十	终止剂	30mL×1瓶	60mL×1瓶	室温
双蒸水		40mL×1瓶	40mL×1瓶	4℃或室温
0.1μmol/mL标准磷应用液的配制: 用时将10mmol/L磷贮备液100倍稀释, 即取0.1mL加双蒸水至10mL。				
0.02μmol/mL磷标准液的配制: 用时将0.1μmol/mL磷标准液用双蒸水5倍稀释, 即取0.1μmol/mL磷标准液1mL加双蒸水4mL。				
定磷剂的配制: 用时取一瓶试剂九甲液加入一瓶已预温好试剂九乙液中, 充分混匀, 需提前0.5小时配制, 2~8℃条件下至少可保存5天, 配好的显色剂的量够做13个管子(如果你的样本量很少, 所需的显色剂的量较少, 那么你可以按试剂九中的甲液: 乙液=7: 6的比例自行配制显色剂, 需多少配多少(按比例配制显色剂时要防止磷污染, 最好用专用吸嘴)。				

二、所需仪器耗材及试剂:

含636nm波长的分光光度计及0.5cm光径比色皿(或酶标仪及96孔板)、37℃水浴锅或恒温箱、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水(0.9%)、涡旋混匀器、试管或离心管、血红蛋白测定试剂(本公司有售)。

三、红细胞的前处理:

①、红细胞计数(见附录)或血红蛋白测定(试剂本所有售)。

②、红细胞溶血液的制备:

a、压积红细胞溶血液的制备: 取肝素抗凝全血, 1000转/分, 离心10分钟, 弃上层血清, 留下层压积红细胞, 取一定量的压积红细胞, 加49倍的双蒸水, 例如取5μL的压积红细胞加入245μL双蒸水中, 混匀, 使其充分溶血, 对光观察直至溶液透亮。如果预试结果太高, 再将溶血液稀释成不同浓度再进行预试后, 再决定取样浓度。

b、全血红细胞溶血液的制备: 取小鼠全血, 轻轻摇匀, 取一定量的全血按照1: 24的体积比加24倍双蒸水, 制成25倍稀释的溶血液, 例如取5μL的全血加双蒸水120μL充分混匀, 制成25倍稀释的溶血液。对光观察直至溶液透亮。如果预试结果太高, 再将溶血液稀释成不同浓度再进行预试后, 再决定取样浓度。

[注1]: 制备好的溶血液尽快进行检测, 否则易失活, 因而必须在所有的准备工作做好以后再配制溶血液。

[注2]: 用不完的抗凝全血4℃可保存2~3天, -20℃以下保存一周或者更长时间。

[注3]: 不可用磷酸盐缓冲液或含磷的试剂稀释样本。

[注4]: 预试结果将绝对吸光度值(测定管吸光度值-对照管吸光度值)控制在0.2左右为宜。

四、规范操作步骤:

1、酶促反应:

	对照管	测定管
试剂一(μL)	70	70
试剂二(μL)	20	
试剂三(μL)		20
试剂四(μL)	20	20
试剂五(μL)		20
试剂六(μL)	20	
样本(μL)		100
混匀, 37℃水浴准确反应10分钟		
试剂七(μL)	50	50
样本(μL)	100	
混匀, 3500转/分, 离心10分钟, 取上清150μL定磷		

2、定磷:

	空白管	标准管	对照管	测定管
双蒸水(mL)	0.15			
0.02μmol/mL磷标准液(mL)		0.15		
上清液(mL)			0.15	0.15
定磷剂应用液(mL)	0.5	0.5	0.5	0.5
混匀, 室温静止2分钟				
终止剂(mL)	0.5	0.5	0.5	0.5
混匀, 37℃静置5-10分钟, 波长636nm, 光径0.5cm, 双蒸水调零, 测定各管吸光度值。				

[注]: 在比色前, 将比色皿用自来水冲洗10余次, 再用双蒸水冲洗4~5次, 以免磷污染。

五、全血中ATPase的计算公式:

1、按红细胞数计算:

①、定义: 规定每小时每10⁷个红细胞中ATP酶分解ATP产生1μmol无机磷的量为一个ATP酶活力单位。即微摩尔磷/10⁷红细胞/小时(μmolPi/10⁷个RBC/hour)(U/10⁷个RBC)。

②、计算公式:

$$Ca^{2+} - ATP酶活力 = \frac{A_{测定} - A_{对照}}{A_{标准} - A_{空白}} \times C_{标准} \times \frac{60}{T} \times N \times 2.8 \div C_{RBC}$$

C_{标准}: 标准品浓度, 0.02μmol/mL;

T: 反应时间, 10min;

2.8: 反应体系稀释倍数(280μL/100μL);

N: 样本测试前稀释倍数;

C_{RBC}: 每毫升全血中RBC(红细胞)个数, 10⁷个/mL。

2、按全血体积计算:

①、定义: 规定每小时每毫升全血中ATP酶分解ATP



产生 1 μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔磷 / 毫升 / 小时 (μmolPi/mL/hour) (U/mL)。

②、公式：

$$\text{Ca}^{2+} - \text{ATP 酶活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{60}{T} \times N \times 2.8$$

C_{标准}:标准品浓度,0.02μmol/mL;

T:反应时间,10min;

2.8:反应体系稀释倍数(280μL/100μL);

N:样本测试前稀释倍数;

3、按血红蛋白量计算：

①、定义：规定每小时每克血红蛋白相当的红细胞中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔磷/克血红蛋白/小时 (μmolPi/gHb/hour)。

②、公式：

$$\text{Ca}^{2+} - \text{ATP 酶活力 (U/gHb)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{60}{T} \times N \times 2.8 \div C_{\text{Hb}}$$

C_{标准}:标准品浓度,0.02μmol/mL;

T:反应时间,10min;

2.8:反应体系稀释倍数(280μL/100μL);

N:样本测试前稀释倍数;

C_{Hb}:溶血液血红蛋白浓度,gHb/mL。

六、测定意义：

ATP 酶存在于组织细胞及细胞器的膜上，是生物膜上的一种蛋白酶，它在物质运送、能量转换以及信息传递方面具有重要的作用，机体在缺氧及一些疾病状态下，此酶活力发生一系列改变。

七、测定原理：

ATP 酶可分解 ATP 生成 ADP 及无机磷，测定无机磷的量可判断 ATP 酶活力的高低。

附录 I：红细胞计数法

红细胞计数有以下三种方法，只需取其中一种即可以。

1、计数板直接红细胞计数：

- ①、红细胞稀释液的配制：柠檬酸三钠 3.8 克，甲醛 1mL，双蒸水 100mL，混匀，4℃ 保存。
- ②、取 1 支试管，加入红细胞稀释液 2mL，取抗凝全血 10μL 加入试管稀释液中，反复吹吸数次，再将试管颠倒数次混匀。
- ③、取一滴稀释血液灌入计数板。（应一次灌满，而且不要灌得太多。）
- ④、用高倍镜计数左上、左下、右上、右下，中央 5 个中方格的红细胞数，将数得的数字 ×10¹⁰，即为每升血中的红细胞数。

2、光电比浊法计红细胞数：

取试管 1 支，加入上述红细胞稀释液 4mL，再取 20μL 抗凝全血，加入 4mL 稀释液中，反复吹吸数次，再将试管颠倒数次混匀，立即倒入比色杯中，于 540nm，1cm 光径，双蒸水调零进行比色，记下吸光度值。以计数板计数的红细胞的数值为横坐标，以相应管的吸光度值为纵坐标，作标准曲线。您可以不做曲线，用附录 II 参考标准曲线图二（鼠红细胞数与比浊法吸光度换算曲线）。根据标准曲线查出红细胞数。

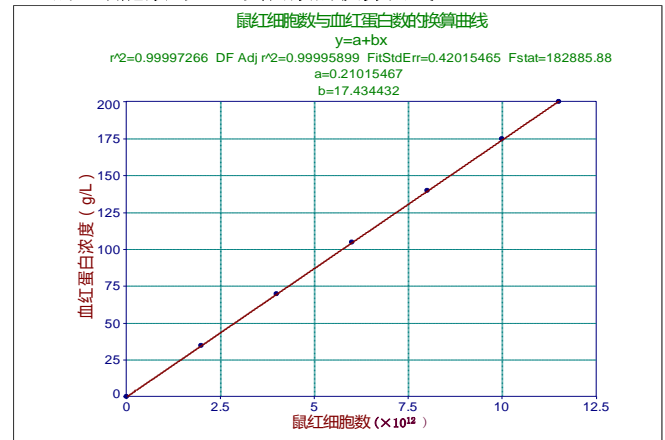
3、用血红蛋白（Hb）来换算红细胞数：

取 10μL 抗凝全血加入 2.5mL 血红蛋白测试液（本所有供应）中，混匀，静置 10 分钟，于 540nm，1cm 光径，

双蒸水调零进行比色。将测得的吸光度乘以 367.7 即为血红蛋白的值。以计数板计数的红细胞的数值为横坐标，以相应管的血红蛋白数为纵坐标，作标准曲线。您可以不做曲线，用附录 II 的参考标准曲线图一（鼠红细胞数与血红蛋白数的换算曲线）。根据标准曲线查出红细胞数。

附录 II：鼠红细胞 ATPase 测定换算曲线

1、鼠红细胞数与血红蛋白数的换算曲线



2、鼠红细胞数与比浊法吸光度换算曲线

