



# 超微量 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶测试盒说明书(精简版)

(货号: A070-4 测组织、培养细胞)

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: (试剂盒有效期 6 个月)

	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、蛋白测定试剂(本公司有售)。

## 三、样本的前处理:

### 1、组织的前处理: (组织匀浆上清液制备参考实验方法学)

准确称取组织重量, 按重量(g): 体积(mL)=1:9的比例, 加入9倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 2500转/分, 离心10分钟, 取上清液(即10%的匀浆上清液), 再用生理盐水10倍稀释成1%, 同时用考马斯亮蓝试剂测定组织蛋白(试剂本所有售)。如果预试结果太高, 再将1%的组织匀浆稀释成不同浓度再进行预试后再决定取样浓度。

### 2、培养细胞的前处理: 将培养细胞消化, 离心, 弃上清, 留下层细胞, 每管加0.2~0.3mL生理盐水或匀浆介质

制备成10<sup>7</sup>/cm<sup>3</sup>细胞悬液, 即10<sup>7</sup>/mL, 再进行破碎。破碎细胞方法有三种: ①、用匀浆器匀浆。②、用超声粉碎机粉碎。③、反复冻溶3次(第③种方法有时会影响酶活力)。制备好的细胞悬液不需要离心, 同时用考马斯亮蓝试剂测定组织蛋白(试剂本所有售)。再将细胞匀浆液稀释成不同浓度进行预试, 根据预试结果决定取样浓度。

[注1]: 在测试加样前要摇匀后取样。

[注2]: 不可用磷酸盐缓冲液或含磷的试剂作为样本匀浆或稀释样本。

[注3]: 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、定磷反应:

	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, 室温静置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、组织中 ATPase 的计算公式:

①、定义: 规定每小时每毫克组织蛋白的组织中 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/毫克蛋白/小时(μmolPi/mgprot/hour)。

### ②、计算公式:

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

C<sub>标准</sub>: 标准品浓度, 0.02μmol/mL;

T: 反应时间, 10min;

2.8: 酶促反应体系稀释倍数(280μL/100μL);

Cpr: 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL。

## 六、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。