



超微量 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ —ATP 酶测试盒说明书(精简版)

(货号: A070-3 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、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。

二、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。

三、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

组份	50 管/24 样 (货号 A070-3-3)	100 管/48 样 (货号 A070-3-4)	保存
试剂一	液体 13mL×1 瓶	13mL×2 瓶	4℃
试剂二	液体 4mL×1 瓶	4mL×2 瓶	4℃
试剂三	粉剂 粉剂×4 支	粉剂×8 支	-20℃
试剂三的配制: 用时每支试剂三粉剂加双蒸水 1mL, 充分溶解。(用不完-20℃以下可保存一周。)			
试剂四	液体 5mL×1 瓶	5mL×2 瓶	4℃
试剂五	甲液 7mL×4 瓶	7mL×8 瓶	4℃
	乙液 6mL×4 瓶	6mL×8 瓶	4℃避光
[注]: 试剂五乙液在冬天或 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。			
试剂六	液体 50mL×1 瓶	50mL×2 瓶	室温
试剂七	10mmol/L 标准磷贮备液 5mL×1 瓶	5mL×1 瓶	4℃
试剂八	液体 4mL×1 瓶	4mL×2 瓶	4℃
试剂九	粉剂 粉剂×4 支	粉剂×8 支	4℃
	稀释液 0.5mL×4 支	0.5mL×8 支	4℃
试剂九的配制: 用时取一支试剂九稀释液加入一支试剂九粉剂中, 充分混匀, 用不完的 4℃保存。			
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。			
基质液的配制: 按试剂一: 试剂二: 试剂三=260: 80: 80 比例混合。需多少配多少, 现用现配。			
显色剂的配制: 用时取一瓶试剂五甲液加入一瓶已预温好试剂五乙液中, 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, 那么你可以按试剂五中的甲液: 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)。			

四、所需仪器耗材及试剂:

含 636nm 波长的分光光度计及 1cm 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)。

五、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。

六、规范操作步骤:

1、酶促反应:

	对照管	测定管
双蒸水 (mL)	0.16	
样本 (mL)		0.1
试剂八 (mL)		0.08
试剂九 (mL)		0.08
试剂一 (mL)	0.26	0.26
试剂二 (mL)	0.08	0.08
试剂三 (mL)	0.08	0.08
混匀, 37℃ 准确反应 10 分钟		
试剂四 (mL)	0.1	0.1
样本 (mL)	0.1	
混匀, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清定磷		

2、定磷反应:

	空白管	标准管	对照管	测定管
双蒸水 (mL)	0.3			
0.02μmol/mL 磷标准液 (mL)		0.3		
上清液 (mL)			0.3	0.3
试剂五显色剂 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀, 室温静置 2 分钟				
试剂六 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀, 37℃ 静置 5-10 分钟, 在 636nm 处, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测各管吸光度值。				

[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。

七、如果你的样本数量很多, 酶促反应可以采用简便操作法:

1、酶促反应:

	对照管	测定管
双蒸水 (mL)	0.16	
样本 (mL)		0.1
试剂八 (mL)		0.08
试剂九 (mL)		0.08
基质液 (mL)	0.42	0.42
混匀, 37℃ 准确反应 10 分钟		
试剂四 (mL)	0.1	0.1
样本 (mL)	0.1	
混匀, 3500 转/分离心 10 分钟, 取上清定磷		

2、定磷反应不变, 与规范操作一致。

八、计算:

1、按红细胞数计算:

①、定义: 规定每小时每 10^7 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 ($\mu\text{molPi}/10^7$ 个 RBC/hour) (U/10⁷ 个 RBC)。

②、计算公式:



$$\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+} - \text{ATP酶活力 (U/10}^7\text{个RBC)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{60}{T} \times N \times 7.8 \div C_{\text{RBC}}$$

C_{标准}:标准品浓度,0.02 $\mu\text{mol/mL}$;

T:反应时间,10min;

7.8:反应体系稀释倍数(0.78mL/0.1mL);

N:样本测试前稀释倍数;

C_{RBC}:每毫升全血中 RBC(红细胞)个数, 10^7 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 ($\mu\text{molPi/mL/hour}$)(U/mL)。

②、计算公式:

$$\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+} - \text{ATP酶活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{60}{T} \times N \times 7.8$$

C_{标准}:标准品浓度,0.02 $\mu\text{mol/mL}$;

T:反应时间,10min;

7.8:反应体系稀释倍数(0.78mL/0.1mL);

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 ($\mu\text{molPi/gHb/hour}$)(U/gHb)。

②、公式:

$$\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+} - \text{ATP酶活力 (U/gHb)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{60}{T} \times N \times 7.8 \div C_{\text{Hb}}$$

C_{标准}:标准品浓度,0.02 $\mu\text{mol/mL}$;

T:反应时间,10min;

7.8:反应体系稀释倍数(0.78mL/0.1mL);

N:样本测试前稀释倍数;

C_{Hb}:溶血液血红蛋白浓度,gHb/mL。

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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
- ②、取 1 支试管,加入红细胞稀释液 2mL,取抗凝全血 10 μL 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 $\times 10^{10}$,即为每升血中的红细胞数。

2、光电比浊法计红细胞数:

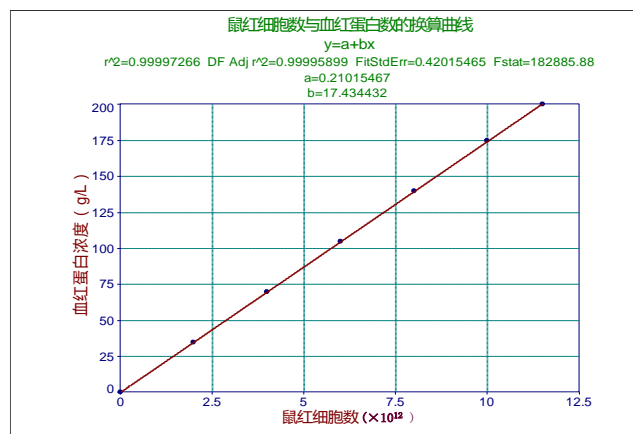
取试管 1 支,加入上述红细胞稀释液 4mL,再取 20 μL 抗凝全血,加入 4mL 稀释液中,反复吹吸数次,再将试管颠倒数次混匀,立即倒入比色杯中,于 540nm,1cm 光径,双蒸水调零进行比色,记下吸光度值。以计数板计数的红细胞的数值为横坐标,以相应管的吸光度值为纵坐标,作标准曲线。您可以不做曲线,用附录 II 参考标准曲线图二(鼠红细胞数与比浊法吸光度换算曲线)。根据标准曲线查出红细胞数。

3、用血红蛋白(Hb)来换算红细胞数:

取 10 μL 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

