



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 (货号 A070-3-1)	100 管/48 样 (货号 A070-3-2)	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
0.1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 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。				
0.02 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 磷标准液的配制: 用时将 0.1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 磷标准液用双蒸水 5 倍稀释, 即取 0.1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 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。(简便操作时配制)				
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))。				

二、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)。

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 $10^7/\text{cm}^3$ 细胞悬液, 即 $10^7/\text{mL}$, 再进行破碎。破碎细胞的方法有三种: 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
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			
0.02 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 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。

五、如果你的样本数量很多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:

	空白管	标准管	对照管	测定管
双蒸水 (mL)	0.3			
0.02 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 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。

六、计算：

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 1 μmol 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 ($\mu\text{molPi/mgprot/hour}$)。

2、计算公式：

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

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);

Cpr:样本蛋白浓度,mgprot/mL。

七、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，另外有些遗传疾病也与此酶活力有关。

八、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。