

# Cu<sup>2+</sup>-ATP 酶测试盒说明书(精简版)

(货号: A057-1-1 100 管/50 样)

**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。Cu<sup>2+</sup>-ATPase 酶是一种能被钾激活而可被钒酸抑制的酶。

## 二、测定意义:

ATP 酶存在于组织细胞膜及细胞器膜上, 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 O<sub>2</sub> 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的高低有关。

## 三、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂编号	试剂名称	包装规格	保存条件
试剂一	液体	10mL×2 瓶	4℃ 保存
试剂二	液体	10mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂三	液体	7mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂四	粉剂	粉剂×3 支	4℃ 保存
	用时每支粉剂加双蒸水 5mL 充分溶解, 配完后 -20℃ 以下保存可放 7 天 (不可反复冻融)		
试剂五	粉剂	粉剂×1 支	4℃ 保存
	用时每支加双蒸水 5mL 充分溶解(适当加热)		
试剂六	粉剂	粉剂×1 支	4℃ 保存
	溶剂	3mL×1 瓶	4℃ 保存
用时将一支粉剂倒入一瓶溶剂中, 充分溶解			
试剂七	液体	10mL×1 瓶	室温保存
试剂八	粉剂	粉剂×3 支	4℃ 保存
	用时每瓶粉剂加双蒸水 40mL 溶解, 4℃ 保存(颜色变深后弃用);		
试剂九	粉剂	粉剂×1 瓶	4℃ 保存
	用时每瓶粉剂加 100mL 双蒸水溶解, 4℃ 保存		
试剂十	2.5mol/L 硫酸	100mL×1 瓶	室温保存
试剂十一	10mmol/L 标准磷贮备液	10mL×1 瓶	4℃ 保存
	用时按贮备液: 双蒸水=1:19 的比例稀释(如取 0.5mL 贮备液加双蒸水定容至 10mL), 配成 0.5μmol/mL 标准磷应用液		

**定磷剂的配制: 按试剂八: 试剂九: H<sub>2</sub>O: 2.5mol/L 硫酸=1:1:2:1 的比例及先后顺序配制, 配好的定磷剂应为浅黄色, 若无色则试剂失效, 若蓝色则为磷污染, 定磷剂需用现配, 需多少配多少。(注意: 配制试剂时, 双蒸水、容器等要防止磷污染。)**

## 四、所需仪器耗材及试剂:

含 660nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪及 96 孔板)、37 及 45℃ 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、烧杯或试剂瓶 (配定磷剂用, 空试剂瓶本公司有售)、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用, 本公司有售)。

## 五、规范操作步骤:

### 1、样本前处理:

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, 制备成 10% 的组织匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取得的上清液再用生理盐水按 1 : 4 稀释制备成 2% 的组织匀浆。(具体操作见本公司《实验方法学》)

## 2、酶促反应:

	对照管	测定管
试剂一 (μL)	130	130
试剂二 (μL)		80
试剂三 (μL)	120	
试剂四 (μL)	40	40
试剂五 (μL)	40	40
试剂六 (μL)		40
样本 (μL)		100
混匀, 37℃ 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 400μL 定磷		

## 3、定磷反应:

管号	标准管	对照管(A 管)	测定管 (B 管)
0.5μmol/mL 标准磷应用液 (μL)	400		
上清液 (μL)		400	400
定磷剂 (μL)	2000	2000	2000
混匀, 45℃ 水浴 5 分钟, 冷却至室温, 在 660nm 处, 1cm 光径, 双蒸水调零, 比色。			

## 六、简便操作法: (如果您的样本数量很多, 您可以参考此方法)

### 1、测试前将对照管试剂及测定管试剂分别配成混合试剂 A 液和 B 液, 具体配法如下:

根据规范操作表中各管的试剂量乘以您所需要测试的样本数 (n) 再多配 1~2 管的量 (避免吸到最后试剂量不够) 然后纵向混合成 A 液 (对照管的加入液) 及 B 液 (测定管的加入液), 具体配制见下表:

管号	对照管(A 液)	测定管 (B 液)
试剂一 (μL)	130×(n+2)	130×(n+2)
试剂二 (μL)		80×(n+2)
试剂三 (μL)	120×(n+2)	
试剂四 (μL)	40×(n+2)	40×(n+2)
试剂五 (μL)	40×(n+2)	40×(n+2)
试剂六 (μL)		40×(n+2)
混合试剂总量 (μL)	330×(n+2)	330×(n+2)
每管应吸液量 (μL)	330	330

### 2、简化操作步骤:

#### ①、酶促反应:

	对照管	测定管
混合试剂 A 液 (μL)	330	
混合试剂 B 液 (μL)		330
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, 离心 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清 400μL 定磷		

#### ②、定磷反应:

管号	标准管	对照管(A 管)	测定管(B 管)
0.5μmol/mL 标准磷应用液 (μL)	400		
对照管上清液 (μL)		400	
测定管上清液 (μL)			400

定磷剂 (μL)	2000	2000	2000
混匀, 45℃水浴 5 分钟, 冷却至室温, 在 660nm 处, 1cm 光径, 双蒸水调零, 比色, 测各管吸光度值 A (OD 值)。			

按照实验需要进行蛋白定量 (本公司有蛋白测定试剂盒供应)

#### 七: 计算:

- 1、定义:** 规定每小时每毫克组织蛋白的 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:

$$\text{Cu}^{2+} - \text{ATP 酶活力} (\mu\text{molPi/mgprot/hour}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times N \times \frac{60}{T} \div \text{Cpr}$$

**C<sub>标准</sub>:** 标准液浓度, 0.5μmol/mL;

**N:** 反应体系稀释倍数, 4.8;

**T:** 反应时间, 10 分钟;

**Cpr:** 样本蛋白浓度, mgprot/mL。

#### 八、注意点:

- 1、此法具有微量、灵敏、快速的特点。所以对测定所用试管要求严格, 要没有一点磷, **最好用除过磷的一次性塑料管或离心管, 避免磷污染也是检测成败的关键。**
- 2、定磷剂配好后, 不可放置太久, 一般最多保存一天, 最好现用现配。随时放冰箱。
- 3、最好采用先配测定管和对照管混合液, 然后按简化操作步骤进行检测, 这样快捷、准确。
- 4、所有配试剂的器皿均要专用, 包括吸硫酸的吸管及盛水的器皿。
- 5、本研究所有加厚的一次性塑料试管供应, 请在订购试剂的同时订购一次性塑料试管。