

ATP 酶测定试剂盒说明书

(货号: A016-2 不高速 可测 Na^+k^+ 、 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATPase)

(本试剂盒可用于测定红细胞膜及动物组织匀浆样本)

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。

二、试剂盒组成与试剂配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂组成	试剂状态	50 管/48 样 A016-2-1	100 管/96 样 A016-2-2	保存条件
试剂一	液体	10mL×3 瓶	10mL×6 瓶	4℃
试剂二	液体	10mL×1 瓶	10mL×2 瓶	4℃
试剂三	液体	10mL×1 瓶	10mL×1 瓶	4℃
试剂四	粉剂	3 支	5 支	-20℃以下
		配置: 用时每支加双蒸水 5mL, 现用现配。余下的-20℃以下可保存一周		
试剂五	粉剂	1 支	2 支	4℃
		配置: 用时加双蒸水 5mL, 适当加热溶解, 4℃保存 3 个月。		
试剂六	粉剂	1 支	2 支	4℃
		配置: 用时加双蒸水 10mL, 充分加热使其完全溶解, 室温保存。(溶解后剩余的下次使用时可能会有结晶, 可再次加热使其溶解后再用)		
试剂七	液体	10mL×2 瓶	10mL×3 瓶	室温
试剂八	粉剂	3 瓶	5 瓶	4℃
		配置: 用时每瓶加双蒸水 40mL 溶解。(溶解后避光 4℃可保存 2~3 周)		
试剂九	粉剂	1 瓶	2 瓶	4℃
		配置: 用时每瓶加双蒸水 100mL 溶解, 室温保存 3 个月有效。		
试剂十	液体	100mL×1 瓶	100mL×2 瓶	室温
试剂十一	10mmol/L 磷标准液	10mL×1 瓶	10mL×1 瓶	4℃
		配置: 将标准原液按 1:19 的比例加双蒸水 (20 倍) 稀释(如取 0.1mL 标准原液加双蒸水 1.9mL), 充分混匀, 配成 0.5μmol/mL 标准磷应用液		

定磷剂的配制: 按试剂八:试剂九:试剂十:双蒸水=1:1:1:2 的比例配制, 配好的定磷剂应为浅黄色, 若无色则试剂失效, 若是蓝色则为磷污染, 定磷剂现用现配。

三、所需仪器及试剂:

可见分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪 (660nm) 及 96 孔板), 涡旋混匀器, 离心机, 37℃ 水浴锅, 双蒸水 (或纯水, 但须洁净无污染), 生理盐水, 蛋白测定试剂 (本公司有售)。

四、操作步骤:

1、样本前处理:

组织样本: 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% 的匀浆液, 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清液待测。(匀浆上清液需测其蛋白浓度, 推荐本公司 A045-2, 考马斯亮兰法试剂盒)

培养细胞: 将培养细胞消化, 离心, 弃上清, 留下层细胞, 用生理盐水或匀浆介质制备成 $10^7/\text{cm}^3$ 的悬液, 即 $10^7/\text{mL}$ 的悬液, 再进行破碎。破碎细胞的方法有三种: ①、用匀浆器匀浆。(可以用匀浆机, 也可以用玻璃匀浆器手工匀浆)②、用进口的超声粉碎机粉碎。③、反复冻溶 3 次。(第③种方法有时会影响酶活力。)制备好的匀浆液不需要离心, 在测试加样前要摇匀后取样。(破碎好的匀浆液需测其蛋白浓度, 推荐本公司 A045-4, BCA 法试剂盒)

全血样本: ①、红细胞计数(详见附录)或血红蛋白测定。两者只需测其中一样。②、洗涤红细胞: 取肝素抗凝全血 1mL, (若血样较少, 则可以按一定比例减少血样及各试剂的用量。)加 4 倍左右的生理盐水(0.86%NaCL 水溶液), 轻轻混匀, 1000~1500 转/分, 离心 5~10 分钟, 弃上清留沉淀的红细胞。③、制备溶血液: 在上述沉淀的红细胞中加入 1.5mL 双蒸水, 将试管放在旋涡混匀器上混匀 30 秒, 放置 15 分钟。再混匀 30 秒, 再放置 15 分钟, 使其充分溶血, 直至溶液透亮。糖尿病大鼠的红细胞是不可以冰冻, 否则越冻越不溶血。④、取溶血液按操作表进行 ATP 酶检测和血红蛋白测定(血红蛋白测定试剂盒本公司有售)。

2、操作表:

(1)、酶促反应: (每管除样本以外要加的其它试剂, 可按操作表比例预先混合好, 一次性加入反应, 可减少操作时间, 但配好的混合试剂需尽快使用)

管号	A 管	B 管	C 管	D 管	E 管
试剂一(μL)	130	130	90	130	90
试剂二(μL)	40	40	40		40
试剂三(μL)				40	40
试剂四(μL)	40	40	40	40	40
试剂五(μL)			40	40	40
试剂六(μL)	40	40	40		
样本(μL)		200	200	200	200
混匀, 37℃ 水浴准确反应 10 分钟。					
试剂七(μL)	50	50	50	50	50
样本(μL)*	200				
混匀, 3000~4000 转/分离心 10 分钟, 取上清 200μL 进行定磷反应。					

(2)、定磷反应:

	标准管	A 管	B 管	C 管	D 管	E 管
0.5μmol/mL 标准磷应用液 (μL)	200					
上清液(μL)		200	200	200	200	200
定磷剂(μL)	2000	2000	2000	2000	2000	2000
混匀, 37℃ 水浴 30 分钟, 冷却至室温, 在 660nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零分光光度计比色, 读取各管吸光值 A (或是每管吸出 200μL 反应液, 加到 96 孔板中, 酶标仪 660nm 处读数)。						

[注 1]: A 管为对照管; B 管为 Na^+k^+ -ATP 酶管; C 管为 Mg^{2+} -ATP 酶管; D 管为 Ca^{2+} -ATP 酶管; E 管为 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶管。(客户可根据需要选用相应的管号进行实验操作)

[注 2]: 定磷反应时注意避免磷污染, 否则影响结果。

[注 3]: 测试前, 最好取 1~2 例样本进行预试, 将测定管吸光值控制在 0.4 以下, 一般可选 2、5、10 倍稀释样本进行预试。

[注 4]: 本试剂盒保证做 100 份 A、B、C、D 管。因目前学术界对钙镁 ATPase 能否分开有争议, 如果不需分开, 即 E 管可以代表 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶; 如果认为可以分开, 即可测 C、D 管来代表 Mg^{2+} -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶。

五、计算:

(一)、组织或细胞中 ATPase 的计算:

1、定义: 规定每小时每毫克组织蛋白的样本中 ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔分子磷/毫克蛋白/小时 (μmolPi/mgprot/hour)。

2、公式:

$$\text{ATP酶活力} \left(\frac{\mu\text{molPi}}{\text{mg蛋白}/\text{hour}} \right) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times 2.5 \times \frac{60}{T} \div C_{\text{pr}}$$

根据标准曲线查出红细胞数。

(二)、全血中 ATPase 的计算:

1、按红细胞数计算:

①、定义:规定每小时每 10^7 个红细胞的 ATP 酶分解 ATP 产生 $1 \mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔分子磷/ 10^7 个红细胞/小时 ($\mu\text{molPi}/10^7$ 个 RBC/hour)。

②、公式:

$$\text{ATP酶活力} \left(\frac{\mu\text{molPi}}{10^7 \text{个RBC}/\text{hour}} \right) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times 2.5 \times \frac{60}{T} \div (C_{\text{RBC}} \div 10^7)$$

2、按血红蛋白量计算:

①、定义:规定每小时每克血红蛋白的红细胞中 ATP 酶分解 ATP 产生 $1 \mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔分子磷/克血红蛋白/小时 ($\mu\text{molPi}/\text{gHb}/\text{hour}$)。

②、公式:

$$\text{ATP酶活力} \left(\frac{\mu\text{molPi}}{\text{gHb}/\text{hour}} \right) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times 2.5 \times \frac{60}{T} \div C_{\text{Hb}}$$

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。

七、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,若试管放过磷酸或磷酸盐缓冲液,一定要洗得非常干净,要先用洗洁精加水煮,再用自来水冲,最后用蒸馏水冲干净。**最好用一次性塑料管或新玻璃管,避免磷污染是检测成败的关键。**
- 2、定磷剂配好后,不可放置太久,一般保存一天,最好现用现配。随时放冰箱。
- 3、最好采用先配 A、B、C、D、E 五种混合液中的几种,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,最好用新的。

附录:红细胞计数方法

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,蒸馏水 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 $10 \mu\text{L}$ 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 $20 \mu\text{L}$ 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,蒸馏水调零进行比色,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 III 的参考标准曲线图二(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 $10 \mu\text{L}$ 抗凝全血加入 2.5mL 血红蛋白测试液中,混匀,静置 10 分钟,于 540nm,1cm 光径,蒸馏水调零进行比色。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 III 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)。