



# 超微量总 ATP 酶测试盒说明书

（货号：A070-1 测组织或普通细胞）

**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 酶存在与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。

## 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、所需仪器及试剂：

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿（或酶标仪（636±0nm）及 96 孔板），涡旋混匀器，离心机，37℃ 水浴锅（或恒温箱），试管或离心管，生理盐水，蛋白测定试剂（本公司有售）。

## 四、试剂盒组成与试剂配制：（试剂盒有效期 6 个月）

	组分	50 管/24 样 (A070-1-1)	100 管/48 样 (A070-1-2)	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℃
	粉剂	粉剂×4 支	粉剂×8 支	-20℃
试剂三	试剂三应用液	的配制：用时每支粉剂加双蒸水 1mL，充分溶解。（用不完 -20℃ 以下可保存一周，避免反复冻融）		
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。				
显色剂的配制：用时取一瓶试剂五甲液加入一瓶已溶解好的试剂五乙液中，充分混匀，需提前半小时配制，2~8℃ 条件下至少可保存 5 天（如果你的样本量很少，所需的显色剂的量较少，那么你可以按甲液：乙液=7：6 的比例配制，需多少配多少）				
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℃
	0.1μmol/mL 磷标准液的配制：用时将 10mmol/L 标准磷贮备液用双蒸水 100 倍稀释，如取 0.01mL 加双蒸水 0.99mL。 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，如取 0.1mL 加双蒸水 0.4mL。			
双蒸水		40mL×1 瓶	40mL×1 瓶	4℃ 或室温
基质液的配制：按试剂一：试剂二：试剂三应用液=260：80：80 比例混合。需多少配多少，现用现配。				

## 五、样本前处理：

- 组织的前处理：**（组织匀浆上清液的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，4000 转/分，离心 10 分钟，取上清液（即 10% 的匀浆上清液）待测（该上清液需测其蛋白浓度（可用考马斯亮蓝法或 BCA 法蛋白定量测试盒，本公司有售）；且需挑 2 例稀释成不同浓度按操作表操作进行预试，选择 A<sub>测定</sub>-A<sub>对照</sub> 在 0.2 左右对应的样本稀释倍数做正式实验（若是该值很小，则需用样本原液，或延长酶促 37℃ 反应时间至 20 分钟或其它，变量代入计算公式）。
- 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（不含磷）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种方法会影响酶活力，不推荐用）。制备好的细胞匀浆液不需要离心，同时需测定其蛋白浓度（可用 BCA 法蛋白定量测试盒，本公司有售）。且需挑 2 例稀释成不同浓度按操作表操作进行预试，选择 A<sub>测定</sub>-A<sub>对照</sub> 在 0.2 左右对应的样本稀释倍数做正式实验（若是该值很小，则需用样本原液，或延长酶促 37℃ 反应时间至 20 分钟或其它，变量代入计算公式）。

[注 1]：样本在测试加样前要摇匀。

[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。

## 六、操作步骤：

- 酶促反应：**（试剂一、试剂二、试剂三应用液可按操作表加入比例及需要量预先混合，一次性加入反应，但混合液需现配现用）

	对照管	测定管
双蒸水（mL）	0.16	0.16
样本（mL）		0.1
试剂一（mL）	0.26	0.26
试剂二（mL）	0.08	0.08
试剂三应用液（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，4000 转/分，离心 10 分钟，取上清作显色反应		

## 2、显色反应：

	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
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，波长 636nm，1cm 光径，双蒸水调零，分光光度计测各管吸光度值 A（或是每管取 200μL 反应液，加到 96 孔板中，636nm 处酶标仪读数）。				

[注]：在分光光度计比色前，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、计算：

### 1、按样本蛋白浓度计算：

**酶活力定义：**每小时每毫克组织（细胞）蛋白中的 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）。

**计算公式：**

$$\text{样本 ATP 酶活力 (U/mg 蛋白)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{60}{T} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times N \div C_{\text{pr}}$$

### 2、按样本质量计算：

**酶活力定义：**每小时每克组织中的 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/克组织/小时（μmolPi/g 组织/hour）。

**计算公式：**

$$\text{样本 ATP 酶活力 (U/g 组织)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{60}{T} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times N \div \frac{W}{W_{\text{样总}}}$$



**以上公式中：**

**C<sub>标准</sub>**为显色反应步骤中磷标准浓度，0.02 $\mu$ mol/mL；

**T**为酶促反应时间，10 分钟；

**V<sub>反应</sub>**为酶促反应体系总体积，0.78mL；

**V<sub>样</sub>**为酶促反应样本加入量。0.1mL；

**N**为匀浆液测试前稀释倍数；

**Cpr**为匀浆液蛋白浓度，mg/mL；

**W**为组织重量，g；

**V<sub>样总</sub>**为样本匀浆（或破碎）时的总体积，mL。