ATP 酶测定试剂盒说明书(精简版)

（货号：A016-1　比色法）

（可测 Na^+k^+、$Ca^{2+}Mg^{2+}$、Ca^{2+}、Mg^{2+}–ATPase　样本需高速离心 ）

此试剂盒可测试高速冷冻离心后的红细胞膜、组织细胞膜、线粒体、微粒体的 ATP 酶。

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）

试剂组成	试剂状态	50 管/48 样 A016-1-1	100 管/96 样 A016-1-2	保存条件
试剂一	液体	10mL×2 瓶	10mL×3 瓶	4℃
试剂二	液体	10mL×1 瓶	10mL×1 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	1 支	4℃
		配置:用时加双蒸水 10mL**[注 1]**，充分加热使其完全溶解，室温保存。		
试剂七	液体	10mL×1 瓶	10mL×1 瓶	室温
		用时按 2:3 的比例加水稀释, 4℃保存		
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℃可保存一周)		
试剂九	粉剂	1 瓶	2 瓶	4℃
		配置:用时加双蒸水 100mL 溶解，室温保存 3 个月。		
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:用时将贮备液 20 倍稀释，如取 0.5mL 加蒸馏水定容至 10mL，配成 **0.5μmol/mL 标准磷应用液**		
双蒸水	-	1 瓶	2 瓶	4℃
定磷剂的配制：按双蒸水:试剂八:试剂九:试剂十=2:1:1:1 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。				

[注 1]：试剂六为过饱和溶液，所以在配制时最好用 90℃～100℃的热双蒸水 10.3mL（热胀冷缩）边隔水加热边用玻璃棒搅拌，以使其充分溶解。一次实验用不完再用时可能有结晶，用之前可以再次边隔水加热边玻璃棒搅拌使其溶解。

[注 2]：配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

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、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。

四、测试所需仪器和试剂：

含 660nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿、电炉(配试剂加热用）37℃及 45℃水浴锅或恒温箱、台式低速离心机、各种规格移液器、烧杯或试剂瓶(用于配制定磷剂，必须干净，空试剂瓶本公司有售)、一次性塑料试管或离心管（0.5ml 及 5ml 或以上规格）、双蒸水（附送 1-2 瓶）、生理盐水（0.9%）、涡旋混匀器、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、酶促反应：

管号	A 管	B 管	C 管	D 管	E 管
试剂一（μL）	70	70	50	70	50
试剂二（μL）	20	20	20		20
试剂三（μL）				20	20
试剂四（μL）	20	20	20	20	20
试剂五（μL）			20	20	20
试剂六（μL）	20	20	20		
样本（μL）		100	100	100	100
混匀，37℃反应准确反应 10 分钟					
试剂七（μL）	50	50	50	50	50
样本（μL）	100				
混匀，　4000 转/分离心 10 分钟，取上清 100μL 定磷					

2、　定磷反应：

管号	标准管	A 管	B 管	C 管	D 管	E 管
1μmol/mL 磷标准液（μL）	100					
上清液（μL）		100	100	100	100	100
定磷剂（μL）	2000	2000	2000	2000	2000	2000
混匀，45℃反应 20 分钟，冷却至室温，在 660nm 处，1cm 光径，双蒸水调零，分光光度计比色。						

[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 $Ca^{2+}Mg^{2+}$–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]：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 $Ca^{2+}Mg^{2+}$–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。

六、参考取样量:

红细胞膜取 100μL，2%组织细胞膜取 100μL，2%线粒体取 100μL，2%微线粒体取 100-200μL。

七、如果您的样本很多可以采用简便操作法：

1、测试前将 A、B、C、D、E 五种混合试剂配制好：

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）再放 1～2 只管的量（避免吸到最后试剂量不够），然后纵向混合。

具体配制见下表：

管号	A 管液体量	B 管液体量	C 管液体量	D 管液体量	E 管液体量
试剂一（μL）	70×(n+2)	70×(n+2)	50×(n+2)	70×(n+2)	50×(n+2)
试剂二（μL）	20×(n+2)	20×(n+2)	20×(n+2)		20×(n+2)
试剂三（μL）				20×(n+2)	20×(n+2)
试剂四（μL）	20×(n+2)	20×(n+2)	20×(n+2)	20×(n+2)	20×(n+2)
试剂五（μL）			20×(n+2)	20×(n+2)	20×(n+2)
试剂六（μL）	20×(n+2)	20×(n+2)	20×(n+2)		
混合试剂总量（μL）	130×(n+2)	130×(n+2)	130×(n+2)	130×(n+2)	130×(n+2)
每管应吸液量(μL）	130	130	130	130	130

2、简化操作步骤:

①、酶促反应

管 号	A 管	B 管	C 管	D 管	E 管
A 液（μL）	130				
B 液（μL）		130			
C 液（μL）			130		
D 液（μL）				130	
E 液（μL）					130

公司地址：南京市玄武区中央路 258-27 号新立基大厦　　邮政编码：210009　　E-Mail：njjcbio@vip.163.com
联系电话：025-83360321、83360969、83551389　　技术支持：025-83360272、19951670086

样本（μL）		100	100	100	100
混匀，37℃反应准确反应 10 分钟。					
试剂七	50	50	50	50	50
样本	100				
混匀，4000 转/分离心 10 分钟，取上清 100μL 定磷。					

②、定磷反应

管号	标准管	A 管	B 管	C 管	D 管	E 管
1**μmol/mL** 磷标准液（μL）	100					
上清液（μL）		100	100	100	100	100
定磷剂（μL）	2000	2000	2000	2000	2000	2000
混匀，45℃反应 20 分钟，冷却至室温，在 660nm 处，1cm 光径，双蒸水调零，分光光度计比色。						

[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 $Ca^{2+}Mg^{2+}$–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]：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 $Ca^{2+}Mg^{2+}$–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。

3、按照蛋白测定方法进行蛋白测定。

八、计算：

1、定义：每小时每毫克蛋白分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即 μmolPi/mgprot/hour（U/mgprot）

2、计算公式：

$$\text{ATP酶活力（U/mgprot）} = \frac{A_{测定} - A_{对照}}{A_{标准}} \times C_{标准} \times N \times 6 \div Cpr$$

6：反应时间为 10 分钟，乘以 6 为 1 小时；

$C_{标准}$：磷标准液浓度，1μmol/mL；

N：酶促反应体系中样本稀释倍数，2.8；

Cpr：样本蛋白浓度，mgprot/mL(prot 指蛋白)。

九、正常参考值：

大鼠组织	Na^+K^+-ATP 酶 (U/mgprot)	Mg^{2+}-ATP 酶 (U/mgprot)	Ca^{2+}-ATP 酶 (U/mgprot)
2%心肌匀浆	8.50±0.78	4.82±0.62	5.32±0.62
10%肾匀浆	1.09±0.19	0.81±0.17	1.03±0.18
10%肝匀浆	0.76±0.13	0.80±0.16	0.79±0.21

十、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，最后用双蒸水冲干净。**最好用一次性塑料管或离心管或新玻璃管，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，包括吸硫酸的吸管及盛水的器皿，最好用新的。
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。

公司地址：南京市玄武区中央路 258-27 号新立基大厦　邮政编码：210009　E-Mail：njjcbio@vip.163.com
联系电话：025-83360321、83360969、83551389　技术支持：025-83360272、19951670086