

超微量 Ca²⁺Mg²⁺-ATP 酶测试盒

(货号: BC111 测组织、培养细胞)

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±10nm) 及 96 孔板), 涡旋混匀器, 离心机, 37°C 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、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

	组份	50 管/24 样	100 管/48 样	保存
试剂一	液体	13mL×1瓶	13mL×2瓶	4°C
试剂二	液体	4mL×1瓶	4mL×2瓶	4°C
试剂三	粉剂	粉剂×4支	粉剂×8支	-20°C
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°C 以下可保存一周。)				
试剂四	液体	5mL×1瓶	5mL×2瓶	4°C
试剂五	甲液	7mL×4瓶	7mL×8瓶	4°C
	乙液	6mL×4瓶	6mL×8瓶	4°C 避光
[注]: 试剂五乙液在冬天或 4°C 长时间保存时可能会出现凝胶状物质, 37°C 溶解不了, 可将其 60°C 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°C
试剂八	液体	4mL×1瓶	4mL×2瓶	4°C
试剂九	粉剂	粉剂×4支	粉剂×8支	4°C
	稀释液	0.5mL×4支	0.5mL×8支	4°C
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°C 保存。				
双蒸水		40mL×1瓶	40mL×1瓶	4°C 或室温
0.1μmol/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 μ mol/mL磷标准液的配制：用时将0.1 μ mol/mL磷标准液用双蒸水5倍稀释，即取0.1 μ mol/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。

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 $^{\circ}$ C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）**。

五、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 10⁷/cm³细胞悬液，即 10⁷/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，同时用相对应的蛋白定量试剂盒定量。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。

六、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 $^{\circ}$ C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：

	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
试剂五显色剂 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀, 室温静止 2 分钟				
试剂六 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀, 37°C 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。

七、如果你的样本数量很多可以采用简便操作法:

1、基质液的配制: 见第一页, 需多少配多少, 现用现配。

	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°C 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:

	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
试剂五显色剂 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀, 室温静止 2 分钟				
试剂六 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀, 37°C 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。

八、计算与举例:

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 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:

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

C_{标准}:标准品浓度,0.02μmol/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。

3、计算举例:

取 0.1%的小鼠肝组织匀浆按操作表进行检测, 测得空白管吸光度为 0.052, 标准管

吸光度为 0.255，对照管吸光度为 0.280,测得 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 管吸光度为 0.360,。同时测得 1%的小鼠肝组织匀浆蛋白含量为 0.998mgprot/mL (0.1%的匀浆蛋白浓度为 0.0998mgprot/mL)。则计算结果为:

$$\begin{aligned}\frac{\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+} - \text{ATP酶}}{\text{活力 (U/mgprot)}} &= \frac{0.360 - 0.280}{0.255 - 0.052} \times 0.02 \times \frac{60}{10} \times 7.8 \div 0.0998 \\ &= 8.316 \quad \text{U/mgprot}\end{aligned}$$

九、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。

十、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。