

ATP 酶测试盒说明书

(不高速可测 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$ 、 Ca^{2+} 、 $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$)

此试剂盒可测不需要高速离心的红细胞膜以及不需要高速离心的组织匀浆中的 ATPase。

比色法：50 管/48 样

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、试剂组成与配制：

试剂一：液体 10ml×3 瓶，4℃保存 6 个月。

试剂二：液体 10ml×1 瓶，4℃保存 6 个月。

试剂三：液体 10ml×1 瓶，4℃保存 6 个月。

试剂四：粉剂×3 支，-20℃以下保存 6 个月。用时每支加蒸馏水至 5ml，现用现配。余下的 -20℃以下可保存一周。

试剂五：粉剂×1 支，4℃保存 6 个月。用时加蒸馏水至 5ml，适当加热溶解，4℃保存 3 个月。

试剂六：粉剂×1 支，4℃保存 6 个月。用时加蒸馏水至 10ml，充分加热使其完全溶解，室温保存。

试剂七：液体 10ml×2 瓶，室温保存 6 个月。

试剂八：粉剂×3 瓶，4℃保存 6 个月。用时每瓶加水至 40ml 溶解。（溶解后避光 4℃可保存一周）。

试剂九：粉剂×1 瓶，4℃保存 6 个月。用时加水至 100ml 溶解，室温保存 3 个月。

试剂十：液体 100ml×1 瓶，室温保存 6 个月。

试剂十一：10mmol/L 标准磷贮备液 10ml×1 瓶，4℃保存 6 个月。0.5 μmol/ml 标准磷应用液配制：用时将贮备液 20 倍稀释，即取 0.5ml 加蒸馏水定容至 10ml。定磷剂的配制：按试剂八：试剂九：蒸馏水：试剂十 =1：1：2：1 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。

三、试剂组成与配制：

试剂一：液体 10ml×6 瓶，4℃保存 6 个月。

试剂二：液体 10ml×2 瓶，4℃保存 6 个月。

试剂三：液体 10ml×1 瓶，4℃保存 6 个月。

试剂四：粉剂×5 支，-20℃以下保存 6 个月。用时每支加蒸馏水至 5ml，现用现配。余下的 -20℃以下可保存一周。

试剂五：粉剂×2 支，4℃保存 6 个月。用时每支加蒸馏水至 5ml，适当加热溶解，4℃保存 3 个月。

试剂六：粉剂×2 支，4℃保存 6 个月。用时每支加蒸馏水至 10ml，充分加热使其完全溶解，室温保存。

试剂七：液体 10ml×3 瓶，室温保存 6 个月。

试剂八：粉剂×5 瓶，4℃保存 6 个月。用时每瓶加蒸馏水至 40ml 溶解。（溶解后避光 4℃可保存一周）。

试剂九：粉剂×2 瓶，4℃保存 6 个月。用时每瓶加蒸馏水至 100ml 溶解，室温保存 3 个月。

试剂十：液体 100ml×2 瓶，室温保存 6 个月。

试剂十一：10mmol/L 标准磷贮备液 10ml×1 瓶，4℃保存 6 个月。0.5 μmol/ml 标准磷应用液配制：用时将贮备液 20 倍稀释，即取 0.5ml 加蒸馏水定容至 10ml。

定磷剂的配制：按试剂八：试剂九：蒸馏水：

试剂十 =1: 1: 2: 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。

四、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)	130	130	90	130	90
试剂二 (μl)	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	200	200	200
混匀，3000~4000 转/分离心 10 分钟，取上清 200 μl 定磷。。					

2、定磷：

	标准管	A管	B管	C管	D管	E管
0.5 μmol/ml 磷标准 (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，蒸馏水调零比色。						

[注 1]: A 管为对照管；B 管为 Na+k+ ATP 酶管；C 管为 Mg2+ ATP 酶管；D 管为 Ca2+ ATP 酶管；E 管为 Ca2+Mg2+ ATP 酶管。(客户可根据需要选用相应的管号进行实验操作)

五、计算：

(一)、全血中 ATPase 的计算：

1、按红细胞数计算：

①、定义：

规定每小时每 107 个红细胞的 ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔分子磷 /107 个红细胞 / 小时 (μmolPi/107 个 RBC/hour)。

②、公式：

$$ATPase \text{ 活力} = \frac{\text{测定值} - \text{对照值}}{\text{标准品浓度}} \times \frac{\text{反应液中样品}}{\text{反应液总体积}} \quad (\text{每毫升溶血液中})$$

$$\left(\frac{\mu\text{molPi}}{10} \times \frac{7 \text{ 个 RBC}}{\text{hour}} \right) = \frac{\text{OD}_{\text{标准}} - \text{OD}_{\text{值}}}{\text{标准 OD 值}} \times \left(\frac{0.5 \mu\text{mol}}{\text{ml}} \times \frac{\text{稀释倍数}}{(2.5^*)} \times 6^{**} \right) \times \left(\frac{\div 10^7}{\text{RBC 个数}} \right)$$

(二)、组织中 ATPase 的计算:

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 1 μmol 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 ($\mu\text{molPi}/\text{mgprot}/\text{hour}$)。

2、公式:

$$\text{组织中 ATPase 活力} \left(\frac{\mu\text{molPi}}{\text{mgprot}} / \text{hour} \right) = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(0.5 \mu\text{mol} / \text{ml})} \times \frac{\text{反应体系中样本}}{\text{稀释倍数}(2.5)} \times 6^{**} \div \frac{\text{匀浆蛋白浓度}}{(\text{mgprot} / \text{ml})}$$

* 稀释倍数 = (130+40+40+40+50+200) / 200 = 2.5

** 水浴时间为 10 分钟，酶活力定义为 1 小时，故乘以 6。

(匀浆蛋白浓度可通过用本所的 A045-2-1 总蛋白定量考马斯亮蓝法试剂盒测定)