

超微量 Ca^{2+} - ATP 酶测试盒

50 管/25 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：

	组份			保存
试剂一	液体	4ml×1 瓶	8ml×1 瓶	4℃保存 6 个月
试剂二	液体	2ml×1 瓶	3ml×1 瓶	4℃保存 6 个月
试剂三	液体	2ml×1 瓶	3ml×1 瓶	4℃保存 6 个月
试剂四	粉剂	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃保存 6 个月
试剂四的配制： 用时每支试剂四粉剂加双蒸水 5ml，充分溶解。（用不完-20℃以下可保存一周。）				
试剂五	粉剂	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃保存 6 个月
试剂五的配制： 用时每支试剂五加双蒸水 5ml，适当加热溶解，4℃保存 3 个月。				
试剂六	粉剂	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃保存 6 个月
试剂六的配制： 用时每支试剂六加双蒸水 10ml，室温保存 3 个月。 [注]：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。				
试剂七	液体	3ml×1 瓶	3ml×1 瓶	4℃保存 6 个月
试剂七的配制： 用时每瓶试剂七加双蒸水 4.5ml，4℃保存 6 个月。				
试剂八	10mmol/L 标准磷 贮备液	5ml×1 瓶	5ml×1 瓶	4℃保存 6 个月
试剂九（定磷剂）	甲液	7ml×2 瓶	7ml×4 瓶	4℃保存 6 个月
	乙液	6ml×2 瓶	6ml×4 瓶	4℃避光保存 6 个月
[注]： 定磷剂乙液在冬天或 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。				
试剂十	终止剂	30ml×瓶	60ml×瓶	室温保存 6 个月
双蒸水		40ml×1 瓶	40ml×1 瓶	4℃或室温保存
0.1 μ mol/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。				
定磷剂的配制： 用时取一瓶试剂九甲液加入一瓶已预温好试剂九乙液中，充分混匀，需提前 0.5 小时配制，2~8℃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，那么你可以按试剂九中的甲液：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）。				

三、样本前处理:

样本处理详见说明书或本公司官网-技术文章部分关于样本处理的说明。测定组织和细胞同时需要测定蛋白浓度。可用总蛋白定量测试盒(考马斯亮蓝法)或者总蛋白定量测试盒(BCA 法)进行蛋白浓度的测定。

四、规范操作步骤:

1、酶促反应:

	对照管	Ca ²⁺ Mg ²⁺ -ATPase 测定管
试剂一 (μl)	70	70
试剂二 (μl)	20	
试剂三 (μl)		20
试剂四 (μl)	20	20
试剂五 (μl)		20
试剂六 (μl)	20	
样 本 (μl)		100
混匀, 37°C 水浴准确反应 10 分钟		
试剂七 (μl)	50	50
样 本 (μl)	100	
混匀, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清 150 μl 定磷。		

2、定磷: (0.02 μ mol/ml 磷标准液及定磷剂的配制见第一页)

	空白管	标准管	对照管	Ca ²⁺ Mg ²⁺ -ATPase 测定管
双蒸水 (ml)	0.15			
0.02 μ mol/ml 磷标准液 (ml)		0.15		
上清液 (ml)			0.15	0.15
定磷剂应用液 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5
混匀, 室温静止 2 分钟				
终止剂 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5
混匀, 室温静置 5 分钟, 在 636nm 处, 0.5cm 光径, 双蒸水调零, 测各管吸光度值。				

五、组织中 ATPase 的计算公式:

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:

$$\text{组织中 ATPase 活力} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{标准品浓度} \div (0.02 \mu\text{mol} / \text{ml})} \times 6^* \times 2.8^{**} \div \text{待测样本蛋白浓度} \quad (\text{mgprot} / \text{ml})$$

[注]: 6*: 定义为每小时, 实际操作为 10 分钟反应, 所以必须乘以 6。

2.8**: 反应体系中 2.8 倍稀释。