

超微量总 ATP 酶测试盒

比色法 100 管/50 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	13ml×1 瓶	13ml×2 瓶	4℃保存 6 个月
试剂二	液体	4ml×1 瓶	4ml×2 瓶	4℃保存 6 个月
试剂三	粉剂	粉剂×4 支	粉剂×8 支	-20℃保存 6 个月
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℃以下可保存一周。）				
试剂四	液体	5ml×1 瓶	5ml×2 瓶	4℃保存 6 个月
试剂五	甲液	7ml×4 瓶	7ml×8 瓶	4℃保存 6 个月
	乙液	6ml×4 瓶	6ml×8 瓶	4℃避光保存 6 个月
[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。				
试剂六	液体	50ml×1 瓶	50ml×2 瓶	室温保存 6 个月
试剂七	10mmol/L 标准磷贮备液	5ml×1 瓶	5ml×1 瓶	4℃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。				
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℃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）。				

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、操作步骤:

1、酶促反应:

	对照管	T-ATPase 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 (ml)	0.08	0.08
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: (0.02 μ mol/ml 磷标准液及显色剂的配制见第一页)

	空白管	标准管	对照管	T-ATPase 测定管
双蒸水 (ml)	0.3			
0.02 μ mol/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, 室温静置 5 分钟, 在 636nm 处, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测各管吸光度值。				

五、单位定义与计算:

1、定义:

规定每小时每毫克组织(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)。

2、计算公式:

$$\begin{array}{l}
 \text{组织、细胞中 ATPase 活} \\
 \text{力} \\
 (U / \text{mgprot})
 \end{array}
 = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(0.02 \mu\text{mol} / \text{ml})} \times 6^* \times 7.8^{**} \times \text{待测样本蛋白浓度}$$

[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。

7.8**: 反应体系中 7.8 倍稀释。

(待测样本蛋白浓度可通过用总蛋白定量考马斯亮蓝法试剂盒测定)