

铜—ATP 酶(Cu-ATPase)测定试剂盒

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。Cu²⁺-ATPase 酶是一种能被钾激活而可被钒酸抑制的酶。

二、试剂组成与配制:

试剂编号	试剂名称	100 管/50 样	保存条件
试剂一	液体	10ml×2 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	7ml×1 瓶	4℃保存 6 个月
试剂四	粉剂	粉剂×3 支	4℃保存 6 个月
试剂四的配制: 用时每支加双蒸水至 5ml 充分溶解, 余下的-20℃以下可保存一周(不可反复冻融)			
试剂五	粉剂	粉剂×1 支	4℃保存 6 个月
试剂五的配制: 用时每支加双蒸水至 5ml 可适当加热充分溶解			
试剂六	粉剂	粉剂×1 支	4℃保存 6 个月
	溶剂	3ml×1 瓶	4℃保存 6 个月
试剂六的配制: 用时将一支粉剂倒入 3ml 溶剂中, 充分溶解			
试剂七	液体	10ml×1 瓶	室温保存 1 年
试剂八	粉剂	粉剂×3 支	4℃保存 6 个月
试剂八的配制: 用时一支加双蒸水至 40ml 溶解, 溶解后 4℃保存一周;			
试剂九	粉剂	粉剂×1 瓶	4℃保存 6 个月

试剂十	2.5mol/L 硫酸	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 μ mol/ml 标准磷应用液配制：按贮备液：双蒸水=1：19 的比例稀释，即取 0.5ml 贮备液加双蒸水定容至 10ml。

定磷剂的配制：按 H₂O：2.5mol/L 硫酸：试剂八：试剂九=2：1：1：1 的比例及先后顺序配制，配好的定磷剂应为浅黄色，若无色则试剂失效，若蓝色则为磷污染，定磷剂需现用现配,需多少配多少。

(注意：配制试剂时，双蒸水、容器等要防止磷污染。)

四、操作步骤：

1、样本前处理：

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，制备成 10%的组织匀浆，2500 转/分，离心 10 分钟，取得的上清液再用生理盐水按 1：4 稀释制备成 2%的组织匀浆。（具体操作见我所《实验方法学》）

2、酶促反应：

	对照管	测定管
试剂一（μl）	130	130
试剂二（μl）		80
试剂三（μl）	120	
试剂四（μl）	40	40
试剂五（μl）	40	40
试剂六（μl）		40
样本（μl）		100
混匀，37℃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 400 μl 定磷		

3、定磷

管号	标准管	对照管	测定管
0.5 μ mol/ml 标准磷应用 (I)	400		
上清液 (I)		400	
定磷剂 (I)	2000	2000	2000
混匀，45℃水浴 5 分钟，冷却至室温，在 660nm 处，1cm 光径，双蒸水调零，比色。			

六：计算及举例：

1、定义：

规定每小时每毫克组织蛋白的 ATP 酶分解 ATP 产生 1 mol 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：

$$Cu^{2+} - ATPase \text{ 活力} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{标准品浓度}} \times \text{反应体系中}^{**} \cdot \text{待测样本蛋白浓度}$$

$$(\mu\text{molPi} / \text{mgprot} / \text{hour}) = \frac{\text{标准 OD 值}}{\text{标准 OD 值}} \times (0.5 \mu\text{mol} / \text{ml}) \times \text{样本稀释倍数} \times 6 \div (\text{mgprot} / \text{ml})$$

[注]: *反应时间为 10 分钟, 酶活力定义为 1 小时, 故乘以 6

**稀释倍数= $130 + 80 + 40 + 40 + 40 + 100 + 50 = 4.8$ 倍