

# ATP 酶测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A016-2 不高速 可测  $\text{Na}^+\text{k}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ -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 ATP 酶。

**免责声明:** 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,

否则由此导致的后果用户自行承担!

一、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

| 试剂组成 | 试剂状态          | 50 管/48 样<br>A016-2-1                                          | 100 管/96 样<br>A016-2-2 | 保存条件   |
|------|---------------|----------------------------------------------------------------|------------------------|--------|
| 试剂一  | 液体            | 10mL×3 瓶                                                       | 10mL×6 瓶               | 4℃     |
| 试剂二  | 液体            | 10mL×1 瓶                                                       | 10mL×2 瓶               | 4℃     |
| 试剂三  | 液体            | 10mL×1 瓶                                                       | 10mL×1 瓶               | 4℃     |
| 试剂四  | 粉剂            | 3 支                                                            | 5 支                    | -20℃以下 |
|      |               | 配置: 用时每支加双蒸水 5mL, 现用现配。余下的-20℃以下可保存一周                          |                        |        |
| 试剂五  | 粉剂            | 1 支                                                            | 2 支                    | 4℃     |
|      |               | 配置: 用时加双蒸水 5mL, 适当加热溶解, 4℃保存 3 个月。                             |                        |        |
| 试剂六  | 粉剂            | 1 支                                                            | 2 支                    | 4℃     |
|      |               | 配置: 用时加双蒸水 10mL[注 1], 充分加热使其完全溶解, 室温保存。                        |                        |        |
| 试剂七  | 液体            | 10mL×2 瓶                                                       | 10mL×3 瓶               | 室温     |
| 试剂八  | 粉剂            | 3 瓶                                                            | 5 瓶                    | 4℃     |
|      |               | 配置: 用时每瓶加双蒸水 40mL 溶解。(溶解后避光 4℃可保存一周)                           |                        |        |
| 试剂九  | 粉剂            | 1 瓶                                                            | 2 瓶                    | 4℃     |
|      |               | 配置: 用时加双蒸水 100mL 溶解, 室温保存 3 个月。                                |                        |        |
| 试剂十  | 液体            | 100mL×1 瓶                                                      | 100mL×2 瓶              | 室温     |
| 试剂十一 | 10mmol/L 磷标准液 | 10mL×1 瓶                                                       | 10mL×1 瓶               | 4℃     |
|      |               | 配置: 用时将贮备液 20 倍稀释, 即取 0.5mL 加蒸馏水定容至 10mL, 配成 0.5μmol/mL 标准磷应用液 |                        |        |

定磷剂的配制: 按双蒸水:试剂八:试剂九:试剂十=2:1:1:1 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。

[注 1]: 试剂六溶解后为过饱和溶液, 所以在配制时最好用 90℃~100℃的热蒸馏水 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。

[注 2]: 配制试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器, 也可以用一次性塑料器皿, 避免磷污染。

## 二、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。

## 三、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。

## 四、测试所需仪器和试剂:

含 660nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿、电炉(配试剂加热用) 37℃ 及 45℃ 水浴锅或恒温箱、台式低速离心机、各种规格移液器、烧杯或试剂瓶(用于配制定磷剂, 必须干净, 空试剂瓶本公司有售)、一次性塑料试管或离心管(0.5ml 及 5ml 或以上规格)、双蒸水(附送 1-2 瓶)、生理盐水(0.9%)、涡旋混匀器、蛋白测定试剂(组织及细胞样本用, 本公司有售)。

## 五、规范操作步骤:

### 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  |     | 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 |     |     |     |     |
| 混匀, 3000~4000 转/分离心 10 分钟, 取上清 200μL 继续进行定磷反应。 |     |     |     |     |     |

### 2、定磷反应:

|                    | 标准管  | A 管  | B 管  | C 管  | D 管  | E 管  |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|
| 0.5μmol/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, 读取吸光值 A。

[注 1]: A 管为对照管; B 管为  $\text{Na}^+\text{k}^+$ -ATP 酶管; C 管为  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶管; D 管为  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶管; E 管为  $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶管。(客户可根据需要选用相应的管号进行实验操作)

[注 2]: 本试剂盒保证做 100 份 A、B、C、D 管。因目前学术界对钙镁 ATPase 能否分开有争议, 如果不需分开, 即 E 管可以代表  $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶; 如果认为可以分开, 即可测 C、D 管来代表  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶。

### 六、如果您的样本很多可以采用简便操作法:

#### 1、测试前 A、B、C、D、E 五种混合试剂的配制:

根据规范操作表中 A、B、C、D、E 各管的试剂量乘以您所需要测试的样本数(n)再放宽 1~2 只的量(避免吸到最后试剂量不够), 然后纵向混合。

具体配制见下表:

| 管 号        | A 管       | B 管       | C 管       | D 管       | E 管       |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 试剂一(μL)    | 130×(n+2) | 130×(n+2) | 90×(n+2)  | 130×(n+2) | 90×(n+2)  |
| 试剂二(μL)    | 40×(n+2)  | 40×(n+2)  | 40×(n+2)  |           | 40×(n+2)  |
| 试剂三(μL)    |           |           |           | 40×(n+2)  | 40×(n+2)  |
| 试剂四(μL)    | 40×(n+2)  | 40×(n+2)  | 40×(n+2)  | 40×(n+2)  | 40×(n+2)  |
| 试剂五(μL)    |           |           | 40×(n+2)  | 40×(n+2)  | 40×(n+2)  |
| 试剂六(μL)    | 40×(n+2)  | 40×(n+2)  | 40×(n+2)  |           |           |
| 混合试剂总量(μL) | 250×(n+2) | 250×(n+2) | 250×(n+2) | 250×(n+2) | 250×(n+2) |
| 每管应吸液量(μL) | 250       | 250       | 250       | 250       | 250       |

### 2、简化操作步骤:

#### (1)、酶促反应:

| 管号                             | A 管 | B 管 | C 管 | D 管 | E 管 |
|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| A 液(μL)                        | 250 |     |     |     |     |
| B 液(μL)                        |     | 250 |     |     |     |
| C 液(μL)                        |     |     | 250 |     |     |
| D 液(μL)                        |     |     |     | 250 |     |
| E 液(μL)                        |     |     |     |     | 250 |
| 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 |     |     |     |     |
| 混匀, 3000~4000 转/分离心 10 分钟, 取上清 |     |     |     |     |     |

200μL 继续进行定磷反应。

## (2)、定磷反应:

|                    | 标准管  | A 管  | B 管  | C 管  | D 管  | E 管  |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|
| 0.5μmol/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, 读取吸光值 A。

## 七、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  $10^7$  个红细胞的 ATP 酶分解 ATP 产生  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔分子磷/ $10^7$  个红细胞/小时 ( $\mu\text{molPi}/10^7$  个 RBC/hour)。

## ②、公式:

$$\text{ATP 酶活力} (\mu\text{molPi}/10^7 \text{ 个 RBC/hour}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times 2.5 \times \frac{60}{T} \div (C_{\text{RBC}} \div 10^7)$$

**C<sub>标准</sub>**: 磷标准液浓度, 0.5μmol/mL;

**2.5**: 酶促反应体系稀释倍数;

**T**: 反应时间, 10min;

**C<sub>RBC</sub>**: 每毫升红细胞数, 个/mL。

## 2、按血红蛋白量计算:

①、定义: 规定每小时每克血红蛋白的红细胞中 ATP 酶分解 ATP 产生  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔分子磷/克血红蛋白/小时 ( $\mu\text{molPi}/\text{gHb}/\text{hour}$ )。

## ②、公式:

$$\text{ATP 酶活力} (\mu\text{molPi}/\text{gHb}/\text{hour}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times 2.5 \times \frac{60}{T} \div C_{\text{Hb}}$$

**C<sub>标准</sub>**: 磷标准液浓度, 0.5μmol/mL;

**2.5**: 酶促反应体系稀释倍数;

**T**: 反应时间, 10min;

**C<sub>Hb</sub>**: 溶血液血红蛋白浓度, gHb/mL。

## (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  $1\mu\text{mol}$  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:

$$\text{ATP 酶活力} (\mu\text{molPi}/\text{mgprot}/\text{hour}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times 2.5 \times \frac{60}{T} \div C_{\text{pr}}$$

**C<sub>标准</sub>**: 磷标准液浓度, 0.5μmol/mL;

**2.5**: 酶促反应体系稀释倍数;

**T**: 反应时间, 10min;

**C<sub>pr</sub>**: 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL。

## 八、注意点:

- 1、此法具有微量、灵敏、快速的特点。所以对测定所用试管要求严格, 要没有一点磷, 若试管放过磷酸或磷酸盐缓冲液, 一定要洗得非常干净, 要先用洗洁精加水煮, 再用自来水冲, 最后用蒸馏水冲干净。最好用一次性塑料管或新玻璃管, 避免磷污染是检测成败的关键。
- 2、定磷剂配好后, 不可放置太久, 一般保存一天, 最好现用现配。随时放冰箱。
- 3、最好采用先配 A、B、C、D、E 五种混合液中的几种, 然后按简化操作步骤进行检测。这样快捷、准确。
- 4、所有配试剂的器皿均要专用, 包括吸硫酸的吸管及盛水的器皿, 最好用新的。
- 5、本研究所有加厚的一次性塑料试管供应, 请在订购试剂的同时订购一次性塑料试管。

## 附录 I: 样本前处理

## 一、样本前处理:

## 1、全血的前处理:

- ①、**红细胞计数**(详见附录 II)或**血红蛋白测定**。两者只需测其中一样。
- ②、**洗涤红细胞**: 取肝素抗凝全血 1mL, (若血样较少, 则可以按一定比例减少血样及各试剂的用量。)加 4 倍左右的生理盐水(0.86%NaCL 液), 轻轻混匀, 1000~1500 转/分, 离心 5~10 分钟, 弃上清留沉淀的红细胞。
- ③、**制备溶血液**: 在上述沉淀的红细胞中加入 1.5mL 双蒸水, 将试管放在旋涡混匀器上混匀 30 秒, 放置 15 分钟。再混匀 30 秒, 再放置 15 分钟, 使其充分溶血, 直至溶液透亮。糖尿病大鼠的红细胞是不可以冰冻, 否则越冻越不溶血。
- ④、取溶血液按操作表进行 ATP 酶检测和血红蛋白测定。

2、**组织的前处理**: 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%的匀浆液, 2500 转/分离心 10 分钟, 取上清 0.2mL 加 0.8mL 生理盐水稀释成 2%的匀浆待测。(取得的上清液同时测一下相应样本的蛋白浓度, 总蛋白测定试剂盒, 本所有售, 推荐 A045-2, 考马斯亮兰法)

3、**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, 用生理盐水或匀浆介质制备成  $10^7/\text{cm}^3$  的悬液, 即  $10^7/\text{mL}$  的悬液, 再进行破碎。破碎细胞的方法有三种: ①、用匀浆器匀浆。(可以用匀浆机, 也可以用玻璃匀浆器手工匀浆。)②、用进口的超声粉碎机粉碎。③、反复冻溶 3 次。(第③种方法有时会影响酶活力。)制备好的匀浆液不需要离心, 在测试加样前要摇匀后取样。(破碎好的匀浆液同时测一下相应样本的蛋白浓度, 总蛋白测定试剂盒, 本所有售, 推荐 A045-4, BCA 法)

## 二、参考取样量:

溶血液一般取 200μL, 2%组织匀浆一般取 200μL, 细胞悬液一般取 200~300μL。如果您的样本量很少, 请用超微量 ATP 酶检测方法。

## 附录 II: 红细胞计数法

红细胞计数有以下三种方法, 只需取其中一种即可以。(我所有制备好的曲线供您参考。)

## 1、计数板直接红细胞计数:

- ①、红细胞稀释液的配制: 柠檬酸三钠 3.8 克, 甲醛 1mL, 蒸馏水 100mL, 混匀, 4℃保存。
- ②、取 1 支试管, 加入红细胞稀释液 2mL, 取抗凝全血 10μL 加入试管稀释液中, 反复吹吸数次, 再将试管颠倒数次混匀。
- ③、取一滴稀释血液灌入计数板。(应一次灌满, 而且不要灌得太多。)
- ④、用高倍镜计数左上、左下、右上、右下, 中央 5 个中方格的红细胞数, 将数得的数字  $\times 10^{10}$ , 即为每升血中的红细胞数。

## 2、光电比浊法计红细胞数:

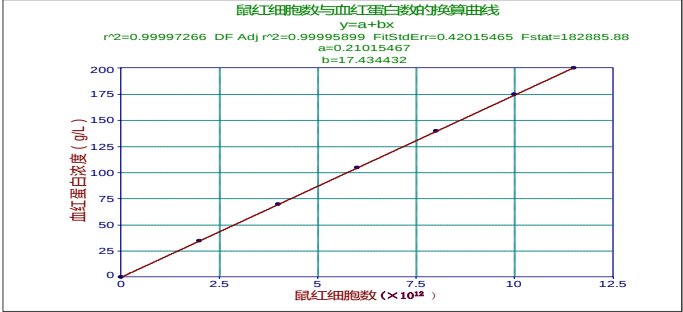
取试管 1 支, 加入上述红细胞稀释液 4mL, 再取 20μL 抗凝全血, 加入 4mL 稀释液中, 反复吹吸数次, 再将试管颠倒数次混匀, 立即倒入比色杯中, 于 540nm, 1cm 光径, 蒸馏水调零进行比色, 记下吸光度值。以计数板计数的红细胞的数值为横坐标, 以相应管的吸光度值为纵坐标, 作标准曲线。您可以不做曲线, 用附录 III 的参考标准曲线图二(鼠红细胞数与比浊法吸光度换算曲线)。根据标准曲线查出红细胞数。

## 3、用血红蛋白(Hb)来换算红细胞数:

取 10 $\mu$ L 抗凝全血加入 2.5mL 血红蛋白测试液中，混匀，静置 10 分钟，于 540nm，1cm 光径，蒸馏水调零进行比色。将测得的吸光度乘以 367.7 即为血红蛋白的值。以计数板计数的红细胞的数值为横坐标，以相应管的血红蛋白数为纵坐标，作标准曲线。您可以不做曲线，用附录Ⅲ的参考标准曲线图一(鼠红细胞数与血红蛋白数的换算曲线)。根据标准曲线查出红细胞数。

附录Ⅲ：鼠红细胞 ATPase 测定换算曲线

1、鼠红细胞数与血红蛋白数的换算曲线



2、鼠红细胞数与比浊法吸光度换算曲线

