

超微量 Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>Mg<sup>2+</sup>、总 ATP 酶测试盒说明书(精简版)

(货号: A070-6 测红细胞)

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 3 个月)

	组份	100 管/25 样 (A070-6-3)	200 管/50 样 (A070-6-4)	保存
试剂一	液体	30mL×1 瓶	30mL×2 瓶	4℃
试剂二	液体	4mL×2 瓶	4mL×4 瓶	4℃
试剂三	粉剂	粉剂×8 支	粉剂×16 支	-20℃

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×2 瓶	5mL×4 瓶	4℃
试剂五	甲液	7mL×8 瓶	7mL×16 瓶	4℃
	乙液	6mL×8 瓶	6mL×16 瓶	4℃避光

注: 试剂五乙液在冬天或 4℃长时间保存时可能会出现凝胶物质, 37℃溶解不了, 可将其 60℃左右水浴 10 分钟即完全溶解; 甲液、乙液应防止磷污染。

试剂六	液体	50mL×2 瓶	50mL×4 瓶	室温
试剂七	10mmol/L 标准磷贮备液	5mL×1 瓶	5mL×1 瓶	4℃
试剂八	液体	4mL×2 瓶	4mL×4 瓶	4℃
试剂九	粉剂	粉剂×4 支	粉剂×8 支	4℃
	稀释液	0.5mL×4 支	0.5mL×8 支	4℃

试剂九的配制: 用时取一支试剂九稀释液加入一支试剂九粉剂中, 充分溶解, 用不完 4℃保存。

试剂十	液体	1mL×2 支	1mL×4 支	4℃
双蒸水		40mL×1 瓶	40mL×1 瓶	4℃或室温

0.1μmol/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。

0.02μmol/mL 磷标准液的配制: 用时将 0.1μmol/mL 磷标准液用双蒸水 5 倍稀释, 即取 0.1μmol/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)。

## 二、所需仪器耗材及试剂:

含 636nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿(或酶标仪及 96 孔板)、37℃水浴锅或恒温箱、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水(0.9%)、涡旋混匀器、试管或离心管、血红蛋白测定试剂(本公司有售)。

## 三、红细胞的前处理:

1、红细胞计数(见附录)或血红蛋白测定(试剂本所有售)。

## 2、红细胞溶血液的制备:

①、压积红细胞溶血液的制备: 取肝素抗凝全血, 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上层血清, 留下层压积红细胞, 取一定量的压积红细胞, 加 49 倍的双蒸水, 例如取 5μl 的压积红细胞加入 245μl 双蒸水中, 混匀, 使其充分溶血, 对光观察直至溶液透亮。如果预试结果太高, 再将溶血液稀释成不同浓度再进行预试后, 再决定取样浓度。

②、全血红细胞溶血液的制备: 取小鼠全血, 轻轻摇匀, 取一定量的全血按照 1: 24 的体积比加 24 倍双蒸水, 制成 25 倍稀释的溶血液, 例如取 5μl 的全血加双蒸水 120μl 充分混匀, 制成 25 倍稀释的溶血液。对光观察直至溶液透亮。如果预试结果太高, 再将溶血液稀释成不同浓度再进行预试后, 再决定取样浓度。

[注 1]: 制备好的溶血液尽快进行检测, 否则易失活, 因而必须在所有的准备工作做好以后再配制溶血液。

[注 2]: 用不完的抗凝全血 4℃可保存 2~3 天, -20℃以下保存一周或者更长时间。

[注 3]: 不可用磷酸盐缓冲液或含磷的试剂稀释样本。

[注 4]: 预试结果将绝对吸光度值(测定管吸光度值—对照管吸光度值)控制在 0.2 左右为宜。

## 四、规范操作步骤:

## 1、酶促反应:

	对照管	Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase 测定管	Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup> -ATPase 测定管	T-ATPase 测定管
双蒸水 (mL)	0.16	0.1		0.16
样本 (mL)		0.1	0.1	0.1
试剂八 (mL)			0.08	
试剂九 (mL)			0.08	
试剂十 (mL)		0.06		
试剂一 (mL)	0.26	0.26	0.26	0.26
试剂二 (mL)	0.08	0.08	0.08	0.08
试剂三 (mL)	0.08	0.08	0.08	0.08
混匀, 37℃准确反应 10 分钟				
试剂四 (mL)	0.1	0.1	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:

	空白管	标准管	对照管	Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase 测定管	Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup> -ATPase 测定管	T-ATPase 测定管
双蒸水 (mL)	0.3					
0.02μmol/mL 磷标准液 (mL)		0.3				
上清液 (mL)			0.3	0.3	0.3	0.3
显色剂 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀, 室温静置 2 分钟						
试剂六 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀, 37℃静置 5-10 分钟, 在 636nm 处, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测各管吸光度值。(在比色前, 将比色皿用自来水冲洗 10 余次, 再用双蒸水冲洗 4~5 次, 以免磷污染)						

## 五、如果你的样本数量很多, 酶促反应可以采用简便操作法:

## 1、酶促反应:

	对照管	Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase 测定管	Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup> -ATPase 测定管	T-ATPase 测定管
双蒸水 (mL)	0.16	0.1		0.16
样本 (mL)		0.1	0.1	0.1
试剂八 (mL)			0.08	
试剂九 (mL)			0.08	
试剂十 (mL)		0.06		
基质液 (mL)	0.42	0.42	0.42	0.42
混匀, 37℃准确反应 10 分钟				
试剂四 (mL)	0.1	0.1	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、定磷反应与之前相同。

## 六、全血中 ATPase 的计算公式与举例:

## 1、按红细胞数计算:

①、定义: 规定每小时每 10<sup>7</sup> 个红细胞中 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/10<sup>7</sup> 红细胞/小时 (μmolPi/10<sup>7</sup> 个 RBC/hour)。

## ②、计算公式:

$$\text{ATPase 活力 (U/10}^7 \text{ 个RBC)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{T}{60} \times N \times 7.8 \div C_{\text{RBC}}$$

**2、按全血体积计算：**

①、定义：规定每小时每毫升全血中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔磷/毫升/小时 (μmolPi/mL/hour)。

②、计算公式：

$$\text{ATPase 活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{T}{60} \times N \times 7.8$$

**3、按血红蛋白量计算：**

①、定义：规定每小时每克血红蛋白相当的红细胞中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔磷/克血红蛋白/小时 (μmolPi/gHb/hour) (U/gHb)。

②、公式：

$$\text{ATPase 活力 (U/gHb)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{T}{60} \times N \times 7.8 \div C_{\text{Hb}}$$

[注]：7.8：反应体系稀释倍数，7.8 倍；

C<sub>标准</sub>：标准品浓度，0.02 μmol/mL；

T：反应时间，10min；

N：样本测试前稀释倍数，25；

C<sub>RBC</sub>：红细胞 (RBC) 密度，10<sup>7</sup> 个/mL。

C<sub>Hb</sub>：血红蛋白含量，gHb/mL。

**七、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，机体在缺氧及一些疾病状态下，此酶活力发生一系列改变。

**八、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。

**附录 I：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。

**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，双蒸水 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 10 μL 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 ×10<sup>10</sup>，即为每升血中的红细胞数。

**2、光电比浊法计红细胞数：**

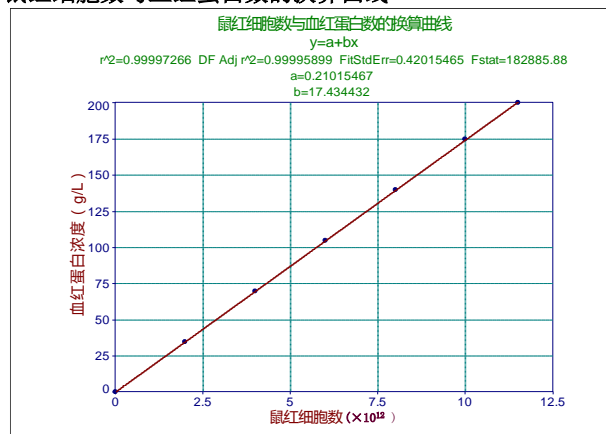
取试管 1 支，加入上述红细胞稀释液 4mL，再取 20 μL 抗凝全血，加入 4mL 稀释液中，反复吹吸数次，再将试管颠倒数次混匀，立即倒入比色杯中，于 540nm，1cm 光径，双蒸水调零进行比色，记下吸光度值。以计数板计数的红细胞的数值为横坐标，以相应管的吸光度值为纵坐标，作标准曲线。您可以不做曲线，用附录 II 参考标准曲线图二 (鼠红细胞数与比浊法吸光度换算曲线)。根据标准曲线查出红细胞数。

**3、用血红蛋白 (Hb) 来换算红细胞数：**

取 10 μL 抗凝全血加入 2.5mL 血红蛋白测试液 (本所有供应) 中，混匀，静置 10 分钟，于 540nm，1cm 光径，双蒸水调零进行比色。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 II 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 II：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**

