

超微量 Na⁺K⁺、Ca²⁺Mg²⁺-ATP 酶测试盒说明书(精简版)

(货号: A070-5 测组织、培养细胞)

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 6 个月)

	组份	75 管/24 样 (A070-5-1)	150 管/48 样 (A070-5-2)	保存条件
试剂一	液体	20mL×1瓶	20mL×2瓶	4℃
试剂二	液体	4mL×2瓶	4mL×4瓶	4℃
试剂三	粉剂	粉剂×6支	粉剂×12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×6瓶	7mL×12瓶	4℃
	乙液	6mL×6瓶	6mL×12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	80mL×1瓶	80mL×2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×3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, 充分混匀, 用不完的 4℃保存。				
试剂十	贮备液	0.1 mL×3支	0.1 mL×6支	4℃
	稀释液	0.9mL×3支	0.9mL×6支	4℃
试剂十的配制: 用时取一支试剂十稀释液加入一支试剂十储备液中, 完全溶解, 用不完的 4℃保存。				
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。(简便操作时配制)				
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、蛋白测定试剂(本公司有售)。

三、样本的前处理:

- 1. 组织的前处理:** (组织匀浆上清液的制备参考实验方法学) 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, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液(即 10%的匀浆上清液), 再用生理盐水 10 倍稀释成 1%, 同时用考马斯亮蓝试剂测定组织蛋白(试剂本所有售)。如果预试结果太高, 再将 1%的组织匀浆稀释成不同浓度再进行预试后再决定取样浓度。
- 2. 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, 每管加 0.2~0.3mL 生理盐水或匀浆介质制备成

10⁷/cm³ 细胞悬液, 即 10⁷/mL, 再进行破碎。破碎细胞的方法有三种: ①、用匀浆器匀浆。②、用超声粉碎机粉碎。③、反复冻溶 3 次(第③种方法有时会影响酶活力)。制备好的细胞悬液不需要离心, 同时用考马斯亮蓝试剂测定组织蛋白(试剂本所有售)。再将细胞匀浆液稀释成不同浓度进行预试, 根据预试结果决定取样浓度。

[注 1]: 在测试加样前要摇匀后取样。

[注 2]: 不可用磷酸盐缓冲液或含磷的试剂作为样本匀浆或稀释样本。

[注 3]: 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 ⁺ k ⁺ -ATPase 测定管	Ca ²⁺ Mg ²⁺ -ATPase 测定管
双蒸水 (mL)	0.16	0.12	
样本 (mL)		0.1	0.1
试剂八 (mL)			0.08
试剂九 (mL)			0.08
试剂十 (mL)		0.04	
试剂一 (mL)	0.26	0.26	0.26
试剂二 (mL)	0.08	0.08	0.08
试剂三 (mL)	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
样本 (mL)	0.1		
充分混匀, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清定磷			

2、定磷反应:

	空白管	标准管	对照管	Na ⁺ k ⁺ - ATP 酶 测定管	Ca ²⁺ Mg ²⁺ - ATP 酶 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
显色剂 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
充分混匀后室温静置 2 分钟					
试剂六 (mL)	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。					

[注]: 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可以采用简便操作法:

1、酶促反应: (基质液的配制见第一页)。

	对照管	Na ⁺ k ⁺ -ATPase 测定管	Ca ²⁺ Mg ²⁺ -ATPase 测定管
双蒸水 (mL)	0.16	0.12	
样本 (mL)		0.1	0.1
试剂八 (mL)			0.08
试剂九 (mL)			0.08
试剂十 (mL)		0.04	
基质液 (mL)	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
样本 (mL)	0.1		
充分混匀, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清定磷			

2、定磷反应:

	空白管	标准管	对照管	Na ⁺ K ⁺ -ATP 酶测定管	Ca ²⁺ Mg ²⁺ -ATP 酶测定管
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
显色剂 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
充分混匀后室温静置 2 分钟					
试剂六 (mL)	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。					

[注]: 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。

六、计算:

- 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 μmol 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) (U/mgprot)。

2、计算公式:

$$\text{ATP酶活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{60}{T} \times N \div C_{\text{pr}}$$

C_{标准}: 磷标准液浓度, 0.02μmol/mL;

T: 酶促反应时间, 10min;

N: 酶促反应体系稀释倍数, 7.8 (0.78mL/0.1mL);

C_{pr}: 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

七、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。

八、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, 另外有些遗传疾病也与此酶活力有关。