

ATP 酶活性检测试剂盒

(样本无需高速离心, 可测 Na^+k^+ 、 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATPase)

说明书修订日期: 2019.01.22

Cat number: KGT026

Store at -20°C for for 6 months

For Research Use Only (科研专用)

一、试剂盒介绍

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。

本试剂盒的测定原理是依据 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。

本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 ATPase。

二、试剂组份

组份名称	KGT026 50tests	保存条件
试剂 A	10mL×3	2-8 $^{\circ}\text{C}$
试剂 B	10mL×1	
试剂 C	10mL×1	
试剂 D	粉剂×3	-20 $^{\circ}\text{C}$
试剂 E	粉剂×1	2-8 $^{\circ}\text{C}$
试剂 F	粉剂×1	
试剂 G	10mL×2	RT
试剂 H	粉剂×3	2-8 $^{\circ}\text{C}$
试剂 I	粉剂×1	
试剂 J: 2.5 mol/L 硫酸	100mL×1	RT
试剂 K: 10 mmol/L 标准磷储液	10mL×1	2-8 $^{\circ}\text{C}$

试剂 D: -20°C 以下保存 6 个月。用时每支加双蒸水至 5ml, 现用现配。余下的 -20°C 以下可保存一周。

试剂 E: 用时每支加双蒸水至 5ml, 适当加热溶解, 4°C 保存 3 个月。

试剂 F: 用时每支加双蒸水至 10ml[注 1], 充分加热使其完全溶解, 室温保存。

试剂 H: 用时每瓶加双蒸水至 40ml 溶解, (溶解后避光 4°C 可保存一周)。

试剂 I: 用时加水至 100ml 溶解, 室温保存 3 个月。

0.5umol/ml 标准磷工作液配制: 用时将试剂 K 作 20 倍稀释: 取 0.5ml 加蒸馏水定容至 10ml。

定磷剂的配制: 按双蒸水: 2.5mol/L 硫酸: 试剂 H: 试剂 I=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 F 为过饱和溶液, 所以在配制时最好用 90°C - 100°C 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用玻璃棒搅拌使其溶解。

[注 2]: 配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。

三、操作步骤

1. 酶促反应:

管号	A 管	B 管	C 管	D 管	E 管
试剂 A (ul)	130	130	90	130	90
试剂 B (ul)	40	40	40		40
试剂 C (ul)				40	40
试剂 D (ul)	40	40	40	40	40
试剂 E (ul)			40	40	40
试剂 F (ul)	40	40	40		
样本 (ul)		200	200	200	200

混匀, 37°C 水浴准确反应 10 分钟。

试剂 G (ul)	50	50	50	50	50
样本 (ul)	200				

混匀, 3000--4000 转/分离心 10 分钟, 取上清 200ul 定磷。

2. 定磷:

	标准管	A 管	B 管	C 管	D 管	E 管
0.5umol/ml 磷标准 (ul)	200					
上清液 (ul)		200	200	200	200	200
定磷剂 (ul)	2000	2000	2000	2000	2000	2000

混匀, 37°C 水浴 30 分钟, 冷却至室温, 在 660nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零比色。

[注 1]: A 管为对照管; B 管为 Na^+K^+ -ATP 酶管; D 管为 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, 如不需要分开, 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 Mg^{2+} -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶。

四、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 (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 管液体量	B 管液体量	C 管液体量	D 管液体量	E 管液体量
试剂 A (ul)	$130 \times (n+2)$	$130 \times (n+2)$	$90 \times (n+2)$	$130 \times (n+2)$	$90 \times (n+2)$
试剂 B (ul)	$40 \times (n+2)$	$40 \times (n+2)$	$40 \times (n+2)$		$40 \times (n+2)$
试剂 C (ul)				$40 \times (n+2)$	$40 \times (n+2)$
试剂 D (ul)	$40 \times (n+2)$				
试剂 E (ul)			$40 \times (n+2)$	$40 \times (n+2)$	$40 \times (n+2)$
试剂 F (ul)	$40 \times (n+2)$	$40 \times (n+2)$	$40 \times (n+2)$		
混合试剂总量 (ul)	$250 \times (n+2)$				
每管应吸液量 (ul)	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 (ul)	250				
B 液 (ul)		250			
C 液 (ul)			250		
D 液 (ul)				250	
E 液 (ul)					250
样本 (ul)	200	200	200	200	200

混匀, 37°C 水浴准确反应 10 分钟。

试剂 G (ul)	50	50	50	50	50
样本 (ul)	200				

混匀, 3000--4000 转/分离心 10 分钟, 取上清 200ul 定磷。

(2)、定磷:

	标准管	A 管	B 管	C 管	D 管	E 管
0.5umol/ml 磷标准 (ul)	200					
上清液 (ul)		200	200	200	200	200
定磷剂 (ul)	2000	2000	2000	2000	2000	2000

混匀, 37°C 水浴 30 分钟, 冷却至室温, 在 660nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零比色。

五、计算与举例:

(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 1umol 无机磷的量一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔分子磷/ 10^7 个红细胞/小时 (umolPi/ 10^7 个 RBC/hour)。

②公式:

$$ATPase \text{ 活力} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{标准 OD 值}} \times \text{标准品浓度} \times \text{反应液中样品稀释倍数} (2.5^*) \times 6^{**} \div [\text{每毫升溶血液中 RBC 个数} \div 10^7]$$

(umolPi/ 10^7 个 RBC/hour) (0.5umol/ml)

*稀释倍数 = (130+40+40+40+50+200) / 200 = 2.5

**水浴时间为 10 分钟, 酶活力定义为 1 小时, 故乘以 6。

③计算举例:

取 1ml 抗凝全血, 测得红细胞数为 $4.8 \times 10^6/\text{mm}^3$ ($4.8 \times 10^6/\text{ul}$), 即 $4.8 \times 10^9/\text{ml}$ 。然后 2000 转/分离心 5-10 分钟, 弃上层血清, 留红细胞沉淀。在沉淀的红细胞中加双蒸水 1.5ml 进行溶血, 反复混匀, 充分溶血; (也可放冰箱上层冻室内 10 分钟, 促其溶血。如果是糖尿病的老鼠, 千万不可以将红细胞冷冻。) 取 0.2ml 溶血液按操作表测 ATPase 活力。测得各管吸光度值: A 管为 0.402, B 管为 0.475, C 管为 0.473, D 管为 0.507, E 管为 0.515, 标准管为 0.475。则计算如下:

$$Na^+K^+ - ATPase \text{ 活力} = \frac{0.475 - 0.402}{0.475} \times 0.5 \times 2.5 \times 6 \div \left[\frac{1.0}{1.5} \times 4.8 \times 10^9 \div 10^7 \right] = 0.0036 \text{ umolPi} / 10^7 \text{ RBC} / \text{hour}$$

$$Mg^{2+} - ATPase \text{ 活力} = \frac{0.473 - 0.402}{0.475} \times 0.5 \times 2.5 \times 6 \div \left[\frac{1.0}{1.5} \times 4.8 \times 10^9 \div 10^7 \right] = 0.0035 \text{ umolPi} / 10^7 \text{ RBC} / \text{hour}$$

$$Ca^{2+} - ATPase \text{ 活力} = \frac{0.507 - 0.402}{0.475} \times 0.5 \times 2.5 \times 6 \div \left[\frac{1.0}{1.5} \times 4.8 \times 10^9 \div 10^7 \right] = 0.0052 \text{ umolPi} / 10^7 \text{ RBC} / \text{hour}$$

$$Ca^{2+} Mg^{2+} - ATPase \text{ 活力} = \frac{0.515 - 0.402}{0.475} \times 0.5 \times 2.5 \times 6 \div \left[\frac{1.0}{1.5} \times 4.8 \times 10^9 \div 10^7 \right] = 0.0057 \text{ umolPi} / 10^7 \text{ RBC} / \text{hour}$$

1.5ml*: 1.5ml 的溶血液

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 μmol 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 ($\mu\text{molPi/gHb/hour}$)。

②公式:

$$\text{ATPase活力} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值}} \times \text{标准品浓度} \times \text{反应液中样品稀释倍数}(2.5) \times 6 \div [\text{溶血液血红蛋白浓度} (\text{gHb/ml})]$$

($\mu\text{molPi/gHb/hour}$)

6*: 水浴时间为 10 分钟, 酶活力定义为 1 小时, 故乘以 6。

③计算举例:

取 1ml 抗凝全血按样本前处理制得溶血液, 取 0.2ml 溶血液按操作表测 ATPase 活力。测得各管吸光度值: A 管为 0.426, B 管为 0.462, C 管为 0.446, D 管为 0.458, 标准管为 0.433, 同时测得溶血液血红蛋白浓度为 79.791 mgHb/ml。则计算如下:

$$\text{Na}^+\text{K}^+ - \text{ATPase活力} = \frac{0.462 - 0.426}{0.433} \times 0.5 \times 2.5 \times 6 \div [79.791 \times 10^{-3} \text{gHb/ml}] = 7.815 \mu\text{molPi/gHb/hour}$$

$$\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase活力} = \frac{0.446 - 0.426}{0.433} \times 0.5 \times 2.5 \times 6 \div [79.791 \times 10^{-3}] = 4.342 \mu\text{molPi/gHb/hour}$$

$$\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase活力} = \frac{0.458 - 0.426}{0.433} \times 0.5 \times 2.5 \times 6 \div [79.791 \times 10^{-3}] = 6.947 \mu\text{molPi/gHb/hour}$$

(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 μmol 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 ($\mu\text{molPi/mgprot/hour}$)。

2、公式:

$$\text{组织中ATPase活力} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值}} \times \text{标准品浓度} \times \text{反应体系中样品稀释倍数}(2.5) \times 6 \div [\text{匀浆蛋白浓度}(\text{mgprot/ml})]$$

($\mu\text{molPi/mgprot/hour}$)

6*水浴时间为 10 分钟, 酶活力定义为 1 小时, 故乘以 6。

3、计算举例:

取 2% 大鼠肝组织匀浆测 ATPase, 测得各管吸光度值: A 管为 0.263, B 管为 0.351, C 管为 0.337, D 管为 0.354, E 管为 0.345, 标准管为 0.425。同时测得 2% 匀浆蛋白浓度为 1.72mgprot/ml。则计算如下:

$$\text{Na}^+\text{K}^+ - \text{ATPase活力} = \frac{0.351 - 0.263}{0.425} \times 0.5 \mu\text{mol/ml} \times 2.5 \times 6 \div 1.72 \text{mgprot/ml} = 0.903 \mu\text{molPi/mgprot/hour}$$

$$\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase活力} = \frac{0.337 - 0.263}{0.425} \times 0.5 \times 2.5 \times 6 \div 1.72 \text{mgprot/ml} = 0.759 \mu\text{molPi/mgprot/hour}$$

$$\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase活力} = \frac{0.354 - 0.263}{0.425} \times 0.5 \times 2.5 \times 6 \div 1.72 \text{mgprot} = 0.934 \mu\text{molPi/mgprot/hour}$$

$$\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase活力} = \frac{0.345 - 0.263}{0.425} \times 0.5 \times 2.5 \times 6 \div 1.72 \text{mgprot} = 0.841 \mu\text{molPi/mgprot/hour}$$

六、注意事项

- 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，避免磷污染是检验成败的关键。**
- 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管。

附录：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。）另一个倍左右的生理盐水（0.86%NaCl液），轻轻混均，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 酶检测的血红蛋白测定。

2、组织的前处理：准确称取组织重量（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，本公司有售，推荐 KGA802，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，本公司有售，推荐 KGP902，BCA 法）。

二、参考取样量：

溶血液一般取 200ul，2% 组织匀浆一般取 200--300ul。如果您的样本是很少，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 10ul 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 20ul 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。以计数反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。你可以不做曲线，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 10ul 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，以相应管的吸光度值为纵坐标，作标准曲线。你可以不做曲线，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。