

总 ATP 酶活性试剂盒

规格：100 管/48 样

检测原理：微量法

编号：ml301009

检测波长：660nm

注意：

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

ATP 酶广泛分布于植物、动物、微生物和细胞中，可催化 ATP 水解生成 ADP 和无机磷。

测定原理：

ATP 酶分解 ATP 生成 ADP 及无机磷，通过测定无机磷的量来确定 ATP 酶活性。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 100mL ×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 6mL 蒸馏水充分混匀待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

试剂三：液体 2mL×1 瓶，4℃保存。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃保存。用时加入 3mL 蒸馏水，4℃保存。

试剂五：粉剂×1 瓶, 4℃避光保存。用时加入 25mL 蒸馏水, 溶解后 4℃保存一周。

试剂六：粉剂×1 瓶, 4℃避光保存。用时加入 25mL 蒸馏水, 溶解后 4℃保存一周。

试剂七：液体 25mL×1 瓶, 室温保存。

试剂八：10mmol/L 标准磷贮备液 10mL×1 瓶, 4℃保存。

0.5μmol/mL 标准磷应用液配制：将试剂八 20 倍稀释, 即取 0.1mL 试剂八加 1.9mL 蒸馏水充分混匀。

定磷剂的配制：按蒸馏水: 试剂五:试剂六:试剂七=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。

注意：全程操作需无磷环境, 配试剂最好用新的枪头、烧杯和玻璃移液器, 也可以用一次性塑料器皿, 避免磷污染。同时也要注意使用的水中无磷污染;

样品酶液的制备:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10⁴个) : 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织：按照组织质量 (g) : 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清 (浆) 样品：直接检测。

测定步骤:

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 660nm, 蒸馏水调零。

2、酶促反应（在 EP 管中加入下列试剂）

	对照管	测定管
试剂一（μL）	65	45
试剂二（μL）	60	60
试剂三（μL）		20
混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确水浴 10min		
样本(μL)		25
试剂四(μL)	25	
样本(μL)	100	
混匀，8000g，25℃离心 10min，取上清液		

3、定磷（在 96 孔板中加入下列试剂）

	空白管	标准管	对照管	测定管
0.5μmol/ml 标准磷应用液（μL）		20		
上清液（μL）			20	20
蒸馏水（μL）	20			
定磷试剂（μL）	200	200	200	200
混匀，室温放置 30min，在 660nm 处，记录各管吸光值				

注 意：

- 1、每一个样都必须做一个对照管
- 2、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无磷。
- 3、空白管和标准管只要做一管。

计算：

1、血清（浆）ATPase 活力的计算:

定义：每小时每毫升血清（浆）中 ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

ATP 酶活 (μmol/h/mL) = [C 标准管 × V 总] × (A 测定管 - A 对照管) ÷ (A 标准管 - A 空白管) ÷ V 样 ÷ T

= 7.5 × (A 测定管 - A 对照管) ÷ (A 标准管 - A 空白管)

2、组织、细菌或细胞中 ATPase 活力的计算：

(1) 按蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{ATP 酶活}(\mu\text{mol/h /mg prot}) &= [\text{C 标准管} \times \text{V 总}] \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div (\text{Cpr} \times \text{V 样}) \div \text{T} \\ &= 7.5 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{ATP 酶活}(\mu\text{mol/h /g 鲜重}) &= [\text{C 标准管} \times \text{V 总}] \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div (\text{W} \times \text{V 样} \div \text{V 样总}) \div \text{T} \\ &= 7.5 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{W}\end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

定义：每小时每 1 万个细菌或细胞中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{ATP 酶活}(\mu\text{mol/h /}10^4 \text{ cell}) &= [\text{C 标准管} \times \text{V 总}] \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div (500 \times \text{V 样} \div \text{V 样总}) \div \text{T} \\ &= 0.015 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})\end{aligned}$$

C 标准管：标准管浓度，0.5 μ mol/mL；V 总：酶促反应总体积，0.25mL；V 样：加入样本体积，0.1mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，1/6 小时；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。