

总酶(ATP)活性试剂盒

规格：100管/48样

检测原理：微量法

编号：JLC_K14883

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。

0.5 μ mol/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. 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（ μ L） | 65 | 45 |
| 试剂二（ μ L） | 60 | 60 |
| 试剂三（ μ L） | | 20 |
| 混匀，37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）准确水浴10min | | |
| 样本(μ L) | | 25 |
| 试剂四(μ L) | 25 | |
| 样本(μ L) | 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。

$$\text{ATP酶活} (\mu\text{mol/h/mL}) = [\text{C标准管} \times \text{V总}] \times (\text{A测定管} - \text{A对照管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \div \text{V样} \div \text{T}$$

$$= 7.5 \times (\text{A测定管} - \text{A对照管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管})$$

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1μmol无机磷的量为一个酶活力单位。

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

$$= 7.5 \times (\text{A测定管} - \text{A对照管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \div \text{Cpr}$$

(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1μmol无机磷的量为一个酶活力单位。

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

$$= 7.5 \times (\text{A测定管} - \text{A对照管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \div \text{W}$$

(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。

ATP酶活(μ mol/h /10⁴ cell) = [C标准管 \times V总] \times (A测定管-A对照管) \div (A标准管-A空白管) \div (500 \times V样 \div V样总) \div T

=0.015 \times (A测定管-A对照管) \div (A标准管-A空白管)

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适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。