

ATP酶测试盒（组织及细胞膜需高速离心）

产品货号：BA2956

产品规格：50 tests/100 tests

产品简介：

ATP酶存在与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。

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。此试剂盒可测试高速冷冻离心后的红细胞膜、组织细胞膜、线粒体、微粒体的ATP酶。（可测 Na^+K^+ 、 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ATPase）。

产品组成：

产品名称	50 tests	100 tests	保存条件	备注
Buffer A	10ml×2瓶	10ml×3瓶	2-8℃	
Buffer B	10ml×1瓶	10ml×1瓶	2-8℃	
Buffer C	10ml×1瓶	10ml×1瓶	2-8℃	
试剂 D	粉剂×3支	粉剂×5支	-20℃以下	用时每支加水至5mL，现用现配。 余下的-20℃以下可保存一周
试剂 E	粉剂×1支	粉剂×2支	2-8℃	用时加水至5mL，适当加热溶解
试剂 F	粉剂×1支	粉剂×1支	室温	用时加水至10mL
Buffer G	10ml×1瓶	10ml×1瓶	2-8℃	用时加水至25mL
试剂 H	粉剂×3瓶	粉剂×5瓶	2-8℃，避光	用时每支加水至40mL溶解，溶解 后2-8℃避光保存一周
试剂 I	粉剂×1瓶	粉剂×2瓶	室温	用时每瓶加水至100mL溶解
Buffer J	100ml×1瓶	100ml×2瓶	2.5mol/L硫酸， 2-8℃	按H ₂ O：试剂J：试剂H：试剂I=2： 1：1：1的比例配制定磷剂
Buffer K	10ml×1瓶	10ml×1瓶	10mmol/L标准 磷储备液 2-8℃	用时将贮备液10倍稀释，即取1mL 加蒸馏水至10mL

1μmol/ mL标准磷应用液：用时将贮备液10倍稀释，即取1mL加蒸馏水至10mL。

按H₂O：试剂J：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，定磷剂需现用现配。

试剂盒以外自备仪器和试剂：

分光光度计/酶标仪/半自动生化分析仪（比色测定波长为412nm）

台式离心机、恒温水浴箱或气浴箱（孵育温度为37℃）、微量移液器、漩涡混匀器

操作步骤：

- 参考取样量：红细胞膜取100μL，2%组织细胞膜取100μL，2%线粒体取100μL，2%微粒体取100~200μL。
- 少量样本检测方法：

1.1 酶促反应

管号	对照管	Na^+K^+ -ATP酶管	Mg^{2+} -ATP酶管	Ca^{2+} -ATP酶管	$\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATP酶管
----	-----	--------------------------------	-------------------------	-------------------------	---------------------------------------



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

Buffer A (μL)	70	70	50	70	50
Buffer B (μL)	20	20	20		20
Buffer C (μL)				20	20
试剂 D (μL)	20	20	20	20	20
试剂 E (μL)			20	20	20
试剂 F (μL)	20	20	20		
待测样本 (μL)		100	100	100	100
混匀, 37°C水浴准确反应10min。					
Buffer G (μL)	50	50	50	50	50
样本 (μL)	100				
混匀, 离心3000—4000rpm×10min, 取上清100μL定磷。					

1.2 定磷反应

	标准管	对照管	Na ⁺ K ⁺ -ATP酶管	Mg ²⁺ -ATP酶管	Ca ²⁺ -ATP酶管	Ca ²⁺ Mg ²⁺ -ATP酶管
1μmol/mL标准磷应用液 (μL)	100					
上清液 (μL)		100	100	100	100	100
定磷剂 (μL)	2000	2000	2000	2000	2000	2000
混匀, 45°C水浴20min, 冷却至室温, 在660nm处, 1cm光径, 蒸馏水调零比色。						

3. 大量样本简便操作法

3.1 测试将A、B、C、D、E五种混合试剂配制好: 根据规范操作表中各管的试剂量乘以您所需要测试的样本数(n)再放1~2只管的量(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	对照管液体量	Na ⁺ K ⁺ -ATP酶管液体量	Mg ²⁺ -ATP酶管液体量	Ca ²⁺ -ATP酶管液体量	Ca ²⁺ Mg ²⁺ -ATP酶管液体量
Buffer A (μL)	70×(n+2)	70×(n+2)	50×(n+2)	70×(n+2)	50×(n+2)
Buffer B (μL)	20×(n+2)	20×(n+2)	20×(n+2)		20×(n+2)
Buffer C (μL)				20×(n+2)	20×(n+2)
试剂 D (μL)	20×(n+2)	20×(n+2)	20×(n+2)	20×(n+2)	20×(n+2)
试剂 E (μL)			20×(n+2)	20×(n+2)	20×(n+2)
试剂 F (μL)	20×(n+2)	20×(n+2)	20×(n+2)		
混合试剂总量 (μL)	130×(n+2)	130×(n+2)	130×(n+2)	130×(n+2)	130×(n+2)
每管应吸液量 (μL)	130	130	130	130	130
混匀, 45°C水浴20min, 冷却至室温, 在660nm处, 1cm光径, 蒸馏水调零比色。					

3.2 酶促反应

管号 (μL)	对照管	Na ⁺ K ⁺ -ATP酶管	Mg ²⁺ -ATP酶管	Ca ²⁺ -ATP酶管	Ca ²⁺ Mg ²⁺ -ATP酶管
A 液 (μL)	130				
B 液 (μL)		130			
C 液 (μL)			130		
D 液 (μL)				130	



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

E 液 (μL)					130
样本 (μL)		100	100	100	100
混匀, 37°C水浴准确反应10min。					
Buffer G	50	50	50	50	50
样本	100				
混匀, 离心3000—4000rpm×10min, 取上清100μL定磷。					

3.3 定磷反应

	标准管	对照管	Na ⁺ K ⁺ -ATP 酶管	Mg ²⁺ -ATP 酶管	Ca ²⁺ -ATP酶管	Ca ²⁺ Mg ²⁺ -ATP 酶管
1μmol/m标准 磷应用液 (μL)	100					
上清液 (μL)		100	100	100	100	100
定磷剂 (μL)	2000	2000	2000	2000	2000	2000
混匀, 45°C水浴20min, 冷却至室温, 在660nm处, 1cm光径, 蒸馏水调零比色。						

4. 计算公式:

每小时每毫克蛋白分解ATP产生1μmol无机磷的量为一个ATP酶活力单位。即μmolPi/mgprot/hour(U/mgprot)

ATPase活力 = ((测定管OD - 对照管OD) ÷ 标准管OD) × 标准品浓度 (1μmol/L) × 反应体系中样本稀释倍数
 ** × 6 * ÷ 样本蛋白浓度***

* 反应时间为10分钟, 乘以6为1小时;

** 酶促反应体系中样本稀释倍数, 2.8;

*** 样本蛋白浓度, mgprot/mL(prot指蛋白)。

注意事项:

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。
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。
3. 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, 一定要洗的非常干净, 要先用洗洁精加水煮, 再用自来水冲, 最后用蒸馏水冲干净。
4. 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。
5. 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, 如果不需分开, 即测Ca²⁺Mg²⁺-ATP酶; 如果认为可以分开可测Mg²⁺ATP酶和Ca²⁺-ATP酶。
6. 最好采用先配A、B、C、D、E五种混合液中的集中, 然后按简化操作步骤进行检测。这样快捷、准确。
7. 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。

实验范例:

大鼠心肌中线粒体的ATPase测定, 测得各管吸光度值: 对照管为0.078; Na⁺K⁺-ATP酶管为0.332; Mg²⁺-ATP酶管为0.325; Ca²⁺-ATP管为0.329; Ca²⁺Mg²⁺-ATP酶管为0.369; 标准管为0.478。线粒体中的蛋白含量为1.99mgprot/mL。则计算如下:

$$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP酶活力} = ((0.332 - 0.078) \div 0.478) \times 1\mu\text{mol/L} \times 2.8 \times 6 \div 1.99\text{mgprot/mL} \\ = 0.254 \times 17.66 = 4.49\text{U/mgprot}$$

$$\text{Mg}^{2+}\text{-ATP酶活力} = (0.325 - 0.078) \times 17.66 = 4.36\text{U/mgprot}$$



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

Ca^{2+} -ATP酶活力= $(0.329-0.078) \times 17.66=4.43\text{U/mgprot}$

$\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATP酶活力= $(0.369-0.078) \times 17.66=5.14\text{U/mgprot}$

正常参考值:

大鼠组织	Na^+K^+ -ATP酶 (U/mgprot)	Mg^{2+} -ATP酶 (U/mgprot)	Ca^{2+} -ATP酶 (U/mgprot)
2%心肌匀浆	8.50 ± 0.78	4.82 ± 0.62	5.32 ± 0.62
10%肾匀浆	1.09 ± 0.19	0.81 ± 0.17	1.03 ± 0.18
10%肝匀浆	0.76 ± 0.13	0.80 ± 0.16	0.79 ± 0.21

保存条件:

-20℃,6个月有效。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com