

## 总ATP酶活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
ATHA9-M48	总ATP酶活性检测试剂 盒	48T	微量法
ATHA9-M96		96T	

### 一、测定意义：

ATP 酶是催化 ATP 水解为 ADP 并释放能量的关键酶类，其活性直接反映细胞能量代谢效率，为离子转运、肌肉收缩、物质合成等所有需能生理过程提供动力。测定该酶活性可评估病理因素或应激对组织能量供应的影响，是解析能量代谢障碍相关疾病机制、临床诊断及动物组织功能健康监测的核心指标。

### 二、测定原理：

ATP 酶可催化 ATP 水解生成 ADP 和无机磷 (Pi)，定磷法通过定磷试剂与反应生成的 Pi 特异性结合，形成蓝色磷钼酸络合物。该络合物在 660nm 下的吸光度值与 Pi 生成量呈线性正相关，通过计算 Pi 产量即可推算出 ATP 酶的活性高低。

### 三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 110mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂一	液体 10mL×1 瓶	液体 20mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂二	液体 5mL×1 瓶	液体 10mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂三	液体 5mL×1 瓶	液体 10mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂四	粉剂 ×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存
<b>试剂四的配制：</b> 用时每瓶粉剂加 5ml 双蒸水，现用现配。使用后剩余试剂-20℃以下可保存一周。			
试剂五	液体 5mL×1 瓶	液体 10mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂六	粉剂 ×1 瓶	粉剂×2 瓶	2~8℃保存
<b>试剂六的配制：</b> 用时每瓶加双蒸水 10mL 溶解，室温保存 3 个月。			
试剂七	粉剂 ×1 瓶	粉剂×2 瓶	2~8℃保存
<b>试剂七的配制：</b> 用时每瓶加双蒸水 10mL 溶解，溶解后避光 4℃可保存一周。			
试剂八	液体 5mL×1 瓶	液体 10mL×1 瓶	2~8℃保存

**定磷剂的配制：**现用现配，按双蒸水:试剂六:试剂七:试剂八=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。

10μmol/mL 标准品	液体 1ml×1 支	液体 1ml×2 支	-20℃保存
------------------	------------	------------	--------

### 四、操作步骤：

#### 样本前处理

- 1、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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。
- 2、细菌、细胞：按照细胞数量 10<sup>4</sup> 个: 提取液体积 (mL) 500~1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3 min），5000 rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

#### 测定步骤

- 1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 660nm，蒸馏水调零；
- 2、测定前将试剂恢复至室温；
- 3、将 10μmol/mL 标准品用双蒸水稀释至 1μmol/mL，备用；
- 4、样本测定：

(1) 酶促反应（在离心管中依次加入下列试剂）：

试剂名称	测定管	对照管
试剂一 (μL)	40	100
试剂二 (μL)	40	-
试剂三 (μL)	10	-
试剂四 (μL)	10	-
样品 (μL)	100	-
混合均匀，37℃ 水浴 20min。		
试剂七 (μL)	50	50
样品 (μL)	-	100

(2) 显色反应（在 96 孔板中依次加入下列试剂）：

试剂名称	测定管	对照管	空白管	标准管
1μmol/mL 标准液 (μL)	-	-	-	20
上清液 (μL)	20	20	-	-
水 (μL)	-	-	20	-
定磷试剂 (μL)	200	200	200	200
混匀, 45℃孵育 20min, 冷却至室温后, 空白管调零, 于波长 660nm 测定各管吸光度。ΔA <sub>测定</sub> =A <sub>测定</sub> -A <sub>对照</sub> , ΔA <sub>标准</sub> =A <sub>标准</sub> -A <sub>空白</sub> 。空白与标准点做 2~3 个即可。				

## 五、总 ATP 酶活性测定:

### 1、按样本蛋白浓度计算

**单位定义:** 每分钟每毫克蛋白分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。

**计算公式:**  $ATP (U/mg \text{ prot}) = C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$   
 $\div T = 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$

### 2、按样本鲜重计算

**单位定义:** 每分钟每克组织消耗 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。

**计算公式:**  $ATP (U/g) = C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$   
 $= 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$

### 3、按照细菌或细胞数量计算

**单位定义:** 每分钟每 1 万个细菌或细胞中 ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。

**计算公式:**  $ATP (U/10^4 \text{ cell}) = C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T$   
 $= 0.00025 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$

$C_{\text{标}}$ : 标准管浓度, 1μmol/mL;  $V_{\text{总}}$ : 酶促反应总体积, 0.25mL;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.1mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1mL;  $T$ : 反应时间, 20min;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白质浓度, mg/mL;  $W$ : 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

## 六、注意事项:

- 1、实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测;
- 2、试剂使用前应充分混匀, 按顺序添加避免交叉污染。

## 【厂家信息】

生产企业: 南京陌凡生物科技有限公司

地址: 南京市栖霞区红枫科技园 A6 栋 2 层

## 【售后微信】



## 【说明书核准及修改日期】

核准日期: 2025 年 4 月 7 日

修改日期: 2025 年 4 月 7 日