天净沙系列

CAT#:EC5.6.1.7

低温运输和保存

天净沙

伴侣蛋白 ATP 酶活性测定试剂盒

Chaperonin ATPases Assay Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品用于测定伴侣蛋白 ATP 酶（Chaperonin ATPases，EC5.6.1.7）活性。其原理是伴侣蛋白 ATP 酶催化 ATP 形成 ADP 和游离的磷酸基团，磷酸基团可以与本产品提供显色液产生有色化合物。该化合物在 636 nm 处有特征光吸收，故可以通过检测吸光度在 636 nm 处随时间的增加量间接检测伴侣蛋白 ATP 酶活性。本产品具有如下特点：

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 最低检测限为 0.18 U，线性范围在 0.25 U-0.71 U 之间。
3. 本试剂盒 1 个酶活性单位的定义是，在 37℃下每小时伴侣蛋白 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 磷酸基团的量为一个伴侣蛋白 ATP 酶活性单位。
4. 本产品足够 100 次 2.3 mL 的比色皿检测。
5. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品第一部分，编号 EC5.6.1.7pt1，大扁盒包装

成份	编号	规格	包装
伴侣蛋白 ATP 酶活性测定反应液成分 1	EC5.6.1.7r1	13 mL×4	15 mL 本色瓶×4
伴侣蛋白 ATP 酶活性测定反应液成分 2	EC5.6.1.7r2	4 mL×4	5 mL 本色瓶×4
伴侣蛋白 ATP 酶活性测定底物干粉	EC5.6.1.7s	16 支	无
伴侣蛋白 ATP 酶活性测定反应终止液	EC5.6.1.7a	5 mL×4	5 mL 本色瓶×4
伴侣蛋白 ATP 酶活性测定显色液成分 1	EC5.6.1.7c1	7 mL×16	15 mL 本色瓶×16
使用手册	EC5.6.1.7sc	1 份	无

本产品第二部分，编号 EC5.6.1.7pt2，大扁盒包装

成份	编号	规格	包装
伴侣蛋白 ATP 酶活性测定显色液成分 2	EC5.6.1.7c2	6 mL×16	15 mL 本色瓶×16
伴侣蛋白 ATP 酶活性测定显色稳定液	EC5.6.1.7b	50 mL×4	50 mL 本色瓶×4
10 mmol/L 磷标准液	EC5.6.1.7d	5 mL×2	5 mL 本色瓶×2
伴侣蛋白 ATP 酶活性测定稀释液	EC5.6.1.7e	40 mL×2	50 mL 本色瓶×2

运输及保存

低温运输，4℃保存，伴侣蛋白 ATP 酶活性测定显色液成分 2 需避光保存，伴侣蛋白 ATP 酶活性测定底物干粉需-20℃保存，有效期半年。

自备物品

待测样品、蛋白浓度测定试剂盒、比色皿及与之匹配的分光光度计、96 孔板及与之匹配的分光光度计，37℃水浴锅或恒温箱、双蒸水。

使用方法

一、首次使用本试剂盒时配制下列溶液

1. 配制伴侣蛋白 ATP 酶活性测定底物液：将 1 mL 伴侣蛋白 ATP 酶活性测定稀释液加入到装有伴侣蛋白 ATP 酶活性测定底物干粉的管中，颠倒摇晃 20 次，得伴侣蛋白 ATP 酶活性测定底物液，此溶液现用现配，没用完的此溶液可于-20℃保存，可保存一周。
2. 配制伴侣蛋白 ATP 酶活性测定显色液：取一瓶伴侣蛋白 ATP 酶活性测定显色液成分 1 加入一瓶已预温好的伴侣蛋白ATP酶活性测定显色液成分 2 中，颠倒摇晃 20 次，得伴侣蛋白 ATP 酶活性测定显色液，此溶液需提前半小时配制，可以进行 13 次 2.3 mL 的比色皿检测，没用完的此溶液需 4℃保存，可保存至少 5 天。注：伴侣蛋白 ATP 酶活性测定显色液成分 2 在冬天或 4℃长时间保存时可能会出现凝胶状物质，37℃溶解不了，可将其 60℃左右水浴 10 分钟即可完全溶解；伴侣蛋白 ATP 酶活性测定显色液及其成分应防止磷污染。
3. 配制 0.02 μmol/L 磷标准液：取 0.1 mL 10 mmol/L 磷标准液，加伴侣蛋白 ATP 酶活性测定稀释液或双蒸水至 10 mL，充分溶解得 0.1 μmol/L 磷标准液。取 1 mL 0.1 μmol/L 磷标准液，加伴侣蛋白 ATP 酶活性测定稀释液或双蒸水至 5 mL，充分溶解得 0.02 μmol/L 磷标准液。

二、待测样本的制备

4. 用自选方式制备待测样本。注意：由于 Cu^{2+}、Zn^{2+}等金属离子可能会改变伴侣蛋白 ATP 酶构象，故样本中不得含有这些物质。同时，由于本试剂盒测定的是磷酸基团，故样本中也不得有磷酸基团的成分，也不得含有其他种类可催化 ATP 产生磷酸基团的 ATP 酶存在。
5. 用自备试剂测定待测样本的蛋白浓度，以备后续计算比活时使用。

三、酶促反应

6. 标记 N+1 个 1.5 mL 塑料离心管，N 个用于待测样品，1 个用于阴性对照。
7. 按下表加入各成分：

成分	对照管	N 个样本管
伴侣蛋白ATP酶活性测定稀释液或双蒸水	160 μL	各 160 μL
N 个待测样品	不加	各 100 μL
伴侣蛋白 ATP 酶活性测定反应液成分 1	260 μL	各 260 μL
伴侣蛋白 ATP 酶活性测定反应液成分 2	80 μL	各 80 μL
伴侣蛋白 ATP 酶活性测定底物液	80 μL	各 80 μL

混合均匀 37℃孵育 10 分钟		
伴侣蛋白 ATP 酶活性测定反应终止液	100 μL	各 100 μL
待测样品	100 μL	不加
混匀，3500×g 离心 10 分钟，取上清液		

四、用光径 1 cm 的比色皿测定光吸收

8. 标记 N+3 个塑料离心管，其中 N 个用于待测样品，1 个用于阴性对照，1 个用于空白对照，1 个用于 0.02 μmol/L 磷标准液。

9. 按下表加入各成分：

成分	空白管	标准管	阴性对照	N 个样本管
伴侣蛋白 ATP 酶活性测定稀释液或双蒸水	300 μL	不加	不加	不加
0.02 μmol/L 磷标准液	不加	300 μL	不加	不加
第 7 步所得对照管上清液	不加	不加	300 μL	不加
第 7 步所得 N 个测定管上清液	不加	不加	不加	各 300 μL
伴侣蛋白 ATP 酶活性测定显色液	1 mL	1 mL	1 mL	各 1 mL
混合均匀，室温静置 2 分钟				
伴侣蛋白 ATP 酶活性测定显色稳定液	1 mL	1 mL	1 mL	各 1 mL
混合均匀，37℃静置 5-10 分钟				

10. 迅速用分光光度计在 636 nm 测定 OD，测前用蒸馏水调零。

五、数据分析

11. 计算真实 OD636 光吸收：每个样本测得的光吸收减去阴性对照的光吸收即为每个样本的光吸收（ΔA 样本），共 N 个读数；0.02 μmol/L 磷标准液的光吸收减去空白管光吸收即为标准光吸收（ΔA 标准）。

12. 根据本产品活性定义可得：伴侣蛋白 ATP 酶浓度（U/mL）= (ΔA 样本/ΔA 标准) ×磷标准液浓度÷反应时间（小时）×稀释倍数= (ΔA 样本/ΔA 标准)× 0.02 ÷ (10/60) ×7.8 = 0.936 × (ΔA 样本/ΔA 标准)。

13. 计算样本的酶比活性：样本总体积乘以酶浓度 U/mL 即得样本总酶单位数 U，样本总体积乘以其蛋白浓度即得样本总蛋白量（以 mg 为单位），样本酶比活（U/mg）=总酶单位数/总蛋白量。

关联产品	蛋白分泌 ATP 酶活性测定试剂盒