

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶活性检测试剂盒说明书

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATPase Assay Kit

可见分光光度法

货号: AK266

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液	50mL×1 瓶	4℃保存;
AK266-A	10mL×1 瓶	4℃保存;
AK266-B	5mL×1 瓶	4℃保存;
AK266-C	5mL×1 瓶	4℃保存;
AK266-D	粉剂×3 支	-20℃保存。用时每支加1mL 蒸馏水, 现用现配。用不完的试剂-20℃可保存一周。
AK266-E	5mL×1 瓶	4℃保存;
AK266-F	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用时加入3mL 蒸馏水, 4℃保存。
AK266-G	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用时加入25mL 蒸馏水, 溶解后4℃保存一周。
AK266-H	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用时加入25mL 蒸馏水, 溶解后4℃保存一周。
AK266-I	25mL×1 瓶	室温保存;
AK266-标储	1mL×1 瓶	10mmol/L 标准磷贮备液, 4℃保存。
标准磷应用液 0.5μmol/mL:	AK266-标储 20 倍稀释, 即取 0.1mL AK266-标储加1.9mL 蒸馏水, 充分混匀即可。	
定磷剂的配制:	按 H ₂ O: AK266-G: AK266-H: AK266-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, 定磷剂现用现配。	

※ 注意: 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。

※ 正式测定前可以取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: Ca⁺⁺Mg⁺⁺-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。

原理: 根据 Ca⁺⁺Mg⁺⁺-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 酶活性高低。

自备用品:

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

样品酶液的制备:

1. 细菌、细胞样品的制备: 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。
2. 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。
3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤

1. 分光光度计预热 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）

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)
AK266-A	130	90
AK266-B	40	40
AK266-C	40	40
AK266-D	40	40
AK266-E		40
样本		200
混匀, 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确水浴 10min		
AK266-F	50	50
样本	200	
混匀, 8000g, 25℃离心 10min, 取上清液		

3. 定磷（1.5mLEP 管中依次加入下列试剂）

	空白管 (μL)	标准管 (μL)	对照管 (μL)	测定管 (μL)
标准磷应用液 0.5μmol/mL		100		
上清液			100	100
蒸馏水	100			
定磷试剂	1000	1000	1000	1000
混匀, 室温放置30min, 在 660nm 处比色, 记录各管吸光值。				

注意事项:

1. 由于每一个样都必须做对照, 本试剂盒 50 管只能测 24 份 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶。
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。**避免磷污染是检测成败的关键。**
3. 空白管和标准管只要做 1-2 次。

$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活性计算公式:

1. 血清（浆） $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活力的计算

定义: 规定每小时每毫升血清（浆）中 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP 酶活力 (U/ mL)} = [\text{C 标准管} \times \text{V 总}] \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{V 样} \div \text{T} = 7.5 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$$

2. 组织、细菌或细胞中 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活力的计算:

(1) 按蛋白浓度计算:

定义: 每小时每毫克组织蛋白中 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP 酶活力 (U/mg)} = [\text{C 标准管} \times \text{V 总}] \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div (\text{V 样} \times \text{Cpr}) \div \text{T} = 7.5 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织中 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP 酶活力 (U/g)} = [\text{C 标准管} \times \text{V 总}] \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div (\text{W} \times \text{V 样} \div \text{V 样总}) \div \text{T} = 7.5 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{W}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

定义: 规定每小时每 1 万个细菌或细胞中 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP 酶活力 (U/10}^4) = [\text{C 标准管} \times \text{V 总}] \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div (500 \times \text{V 样} \div \text{V 样总}) \div \text{T} = 0.015 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$$

注: C 标准管: 标准管浓度, 0.5μmol/mL; V 总: 酶促反应总体积, 0.5mL; V 样: 加入样本体积, 0.2mL; 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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit (C05-02001)