

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶活性检测试剂盒说明书

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATPase Assay Kit

微量法

货号: AK267

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液	60mL ×1 瓶	4℃保存;
AK267-A	10mL×1 瓶	4℃保存;
AK267-B	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 4℃ 保存一周;
AK267-C	2mL×1 瓶	4℃保存;
AK267-D	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用时加入3mL 蒸馏水, 4℃保存。
AK267-E	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用时加入5mL 蒸馏水, 溶解后4℃保存一周。
AK267-F	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用时加入5mL 蒸馏水, 溶解后4℃保存一周。
AK267-G	5mL×1 瓶	室温保存。
AK267-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:	AK267-标储 20 倍稀释,即取 0.1mL AK267-标储加1.9mL 蒸馏水, 充分混匀即可。	
定磷剂的配制:	按 H ₂ O: AK267-E: AK267-F: AK267-G= 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。

※ 正式测定前务必取 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/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、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/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）

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)
AK267-A	65	45
AK267-B	60	60
AK267-C		20
样本		100
混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确水浴 10min		
AK267-D	25	25
样本	100	
混匀，8000g，25℃离心 10min，取上清液		

3. 定磷（在EP 管或96 孔板中加入下列试剂）

	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		20		
上清液			20	20
蒸馏水	20			
定磷试剂	200	200	200	200
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 100 管只能测 48 份 Ca⁺⁺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。

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶活性计算公式：

1. 血清（浆）Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶活力的计算

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

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶活力(U/ mL) = [C 标准管×V 总]×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)÷V 样×T=7.5×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)

2. 组织、细菌或细胞中 Ca⁺⁺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 Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶活力 (U/mg prot) = [C 标准管×V 总]×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)÷(V 样×Cpr)÷T = 7.5×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)÷Cpr

（2）按样本鲜重计算：

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

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶活力 (U/g 鲜重) = [C 标准管×V 总]×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)÷(W×V 样÷V 样总)÷T = 7.5×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)÷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 Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶活力(U/10⁴ cell) = [C 标准管×V 总]×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)÷(500×V 样÷V 样总)÷T = 0.015×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-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，0.25mL；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。

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