

Ca²⁺ Mg²⁺-ATP 酶试剂盒说明书

(货号: PB1046F24 分光法 24 样)

有效期: 3 个月

测定意义:

Ca²⁺ Mg²⁺-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。

测定原理:

根据 Ca²⁺ Mg²⁺-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。

需自备的仪器及用品:

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。

试剂的组成和配制:

提取液: 液体 50mL ×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 液体 10mL ×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 液体 5mL ×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂三: 液体 5mL ×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂四: 粉剂 ×3 支, 4℃ 保存。用时每支加 1mL 蒸馏水, 现用现配。用不完的试剂 4℃ 可保存一周。

试剂五: 液体 5mL ×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂六: 粉剂 ×1 瓶, 4℃ 保存。用时加入 3mL 双蒸水, 4℃ 保存。

试剂七: 粉剂 ×1 瓶, 4℃ 保存。用时加入 25mL 双蒸水, 溶解后 4℃ 保存一周。

试剂八: 粉剂 ×1 瓶, 4℃ 保存。用时加入 25mL 双蒸水, 溶解后 4℃ 保存一周。

试剂九: 液体 25mL ×1 瓶, 室温保存。

试剂十: 10mmol/L 标准磷贮备液 10mL ×1 瓶, 4℃ 保存。

0.5μmol/mL 标准磷应用液配制: 将试剂十 20 倍稀释, 即取 0.1mL 试剂十加 1.9mL 蒸馏水充分混匀。

定磷剂的配制: 按 H₂O: 试剂七: 试剂八: 试剂九=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。

样品酶液的制备:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

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; 按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织 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。

2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

操作步骤:

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)

	对照管	测定管
--	-----	-----

试剂一 (μL)	130	90
试剂二 (μL)	40	40
试剂三 (μL)	40	40
试剂四 (μL)	40	40
试剂五 (μL)		40
样品 (μL)		200

混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 准确水浴 10min

试剂六 (μL)	50	50
样品 (μL)	200	

混匀, 4000g, 常温离心 10min, 取上清液

3 定磷 (1.5mLEP 管中依次加入下列试剂)

	空白管	标准管	A 管	B 管
0.5μmol/ml 标准磷应用液 (μL)		100		
上清液 (μL)			100	100
蒸馏水 (μL)	100			
定磷试剂 (μL)	1000	1000	1000	1000

混匀, 37℃ 水浴 30 min, 冷却至室温, 在 660nm 处比色。

注意事项:

- 1、A 管为对照管; B 管为 $\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATP 酶测定管;
- 2、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。
- 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无磷。避免磷污染是检测成败的关键。
- 4、空白管和标准管只要做一管

计算

1、血清 (浆) $\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATPase 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。

$\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活力 (U/mL)

$$= C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div V \text{ 样} \div T$$

$$= 7.5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

组织中 $\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATPase 的计算:

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

(1) 按蛋白浓度计算:

定义: 规定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。

$\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活力 (U/mg)

$$= C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div (C_{\text{pr}} \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 7.5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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



$\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活力(U/g)

$= C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T$

$= 7.5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$ (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 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活力(U/ 10^4)

$= C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) \div T$

$= 0.015 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$

C 标准管: 标准管浓度, $0.5\mu\text{mol/mL}$; 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。