

Ca²⁺ Mg²⁺-ATP 酶试剂盒说明书

(货号: PB1046W48 微量法 48 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/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 液体 100mL ×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 液体 10mL ×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 粉剂 ×1 瓶, 4℃ 保存; 临用前加入 6mL 蒸馏水充分混匀待用;

试剂三: 液体 2mL ×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂四: 粉剂 ×1 瓶, 4℃ 保存。用时加入 3mL 双蒸水, 4℃ 保存。

试剂五: 粉剂 ×1 瓶, 4℃ 保存。用时加入 25mL 双蒸水, 溶解后 4℃ 保存一周。

试剂六: 粉剂 ×1 瓶, 4℃ 保存。用时加入 25mL 双蒸水, 溶解后 4℃ 保存一周。

试剂七: 液体 25mL ×1 瓶, 室温保存。

试剂八: 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: 将试剂八 20 倍稀释, 即取 0.1mL 试剂八加 1.9mL 蒸馏水充分混匀。

定磷剂的配制: 按 H₂O: 试剂五: 试剂六: 试剂七=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、分光光度计或酶标仪预热 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)

	对照管	测定管
试剂一 (μL)	65	45

试剂二 (μL)	60	60
试剂三 (μL)		20
样品 (μL)		100

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

试剂四 (μL)	25	25
样品 (μL)	100	

混匀, 4000g, 常温离心 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	标准管	对照管	测定管
0.5μmol/ml 标准磷应用液 (μL)		20		
上清液 (μL)			20	20
蒸馏水 (μL)	20			
定磷试剂 (μL)	200	200	200	200

混匀, 室温放置 30min, 在 660nm 处, 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 $\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -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一管。

$\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATPase 活力的计算:

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)

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

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

2、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)

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

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

3、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)

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

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

4、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。

$\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活力 (U/10⁴)



$$= C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) \div T$$
$$= 0.015 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

C 标准管：标准管浓度，0.5 μ mol/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。