

Ca⁺⁺Mg⁺⁺ - ATP 酶活性检测试剂盒 (分光光度计法)
(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0209	Ca ⁺⁺ Mg ⁺⁺ - ATP 酶活性检测试剂盒	50 管/24 样

产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体 50mL × 1 瓶	4℃
试剂一	液体 10mL × 1 瓶	4℃
试剂二	液体 5mL × 1 瓶	4℃
试剂三	液体 5mL × 1 瓶	4℃
试剂四	粉剂 × 3 支: 用时每支加 1mL 蒸馏水, 现用现配; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。	-20℃
试剂五	液体 5mL × 1 瓶	4℃
试剂六	粉剂 × 1 瓶: 用时加入 3mL 蒸馏水, 4℃保存。	4℃
试剂七	粉剂 × 1 瓶: 用时加入 25mL 蒸馏水, 溶解后 4℃保存一周。	4℃
试剂八	粉剂 × 1 瓶: 用时加入 25mL 蒸馏水, 溶解后 4℃保存一周。	4℃
试剂九	液体 25mL × 1 瓶	室温
试剂十	液体 10mL × 1 瓶: 10mmol/L 标准磷贮备液。	4℃
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 H ₂ O: 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: 配试剂最好用新的玻璃烧杯、玻棒和玻璃移液器, 避免磷污染。		

一、产品说明

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。

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。

二、自备材料

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。

三、样品制备

- 1、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。
- 2、细胞/细菌: 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)

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。

3、血浆/血清: 直接检测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

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 1.5mL 棕色 EP 管中依次加入下列试剂) :

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
试剂一	130	90
试剂二	40	40
试剂三	40	40
试剂四	40	40
试剂五		40
样本		200
混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 准确水浴 10min。		
试剂六	50	50
样本	200	
混匀, 8000g, 25℃ 离心 10min, 取上清液 (溶液需澄清)。		

3、定磷 (在 1.5mL 棕色 EP 管中依次加入下列试剂) :

试剂名称 (μL)	空白管	标准管	对照管	测定管
0.5μmol/mL 标准磷应用液		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, 记录各管吸光值。 (注: 看空白管是否有磷污染, 若有污染, 则实验结果将不准确)				

五、酶活的计算

1、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 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。

$\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活力(μmol/h/mg)=[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、按照样本鲜重计算:

酶活定义: 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。

$\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活力(μmol/h/g)=[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、按照细胞/细菌数量计算:

酶活定义: 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($\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{cell}$) = $[\text{C 标准管} \times \text{V 总}] \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div (500 \times \text{V 样} \div \text{V 样总}) \div \text{T}$
 $= 0.015 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$ 。

4、按照血清/血浆体积计算:

酶活定义: 每小时每毫升血清(浆)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 ($\mu\text{mol/h} / \text{mL}$) = $[\text{C 标准管} \times \text{V 总}] \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{V 样} \div \text{T} = 7.5 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$ 。

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。

六、注意事项

- 1、空白管务必要注意是否有磷污染, 如有磷污染, 实验结果不能使用。
- 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。