

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)
AK267-A	65	45
AK267-B	60	60
AK267-C		20
样本		100
混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其他物种) 准确水浴 10min		
AK267-D	25	25
样本	100	
混匀, 8000g, 25°C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一管。

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(μmol/h/ 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。

a⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶活力 (μmol/h/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 (μmol/h/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(μmol/h/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)