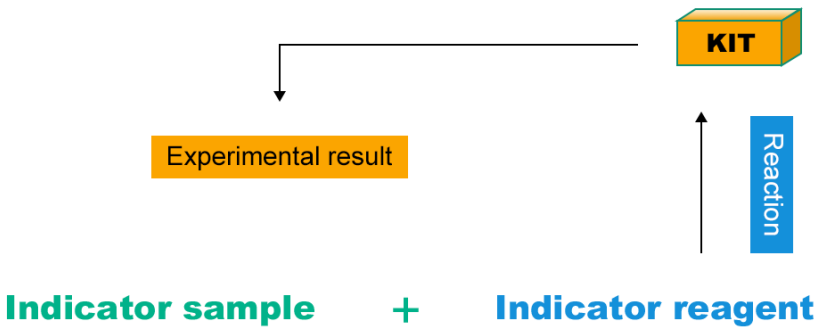
上海茁彩生物科技有限公司

ZCIBIO Technology Co.,Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO：ZC-S0642 Size：50T/24S

Ca++Mg++ ——ATP 酶检测试剂盒说明书

可见分光光度法

***正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定**

一、测定意义：

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。

二、测定原理：

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。

三、需自备的仪器和用品：

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。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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	-20℃保存	用时每支加1mL 蒸馏水，现用现配。用不完的试剂-20℃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 蒸馏水， 4℃保存
试剂七	粉剂×1 瓶	4℃保存	用时加入 25mL 蒸馏水，溶解后 4℃保存一周
试剂八	粉剂×1 瓶	4℃保存	用时加入 25mL 蒸馏水，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H_2O：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。

五、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（10^4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。

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、 血清（浆）样品：直接检测。

六、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
样本 （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
样本 （μL）	200	
混匀，8000g，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	对照管	测定管
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，室温放置 30 min，在 660nm 处比色。

七、注意事项：

1、 由于每一个样都必须做对照，本试剂盒50管只能测24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。

八、计算

1、 血清（浆）$Ca^{++}Mg^{++}$-ATPase 活力的计算：

定义：规定每小时每毫升血清（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$Ca^{++}Mg^{++}$-ATPase 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。

ATP 酶活力(U/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位。

Ca++ Mg++-ATP 酶活力(U/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/10^4)= [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）

C标准管：标准管浓度，0.5μmol/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。