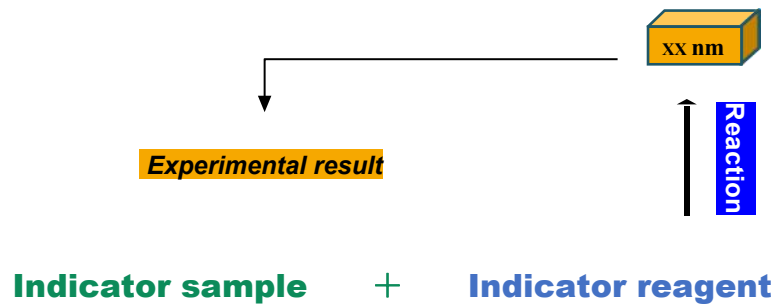


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶活性测定说明书

微量法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

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。

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。

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：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	使用前每瓶加入 10 mL 蒸馏水充分混匀
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；用不完的试剂 4℃保存一周；
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蒸馏水， 4℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	4℃保存	用时加入25mL蒸馏水，溶解后 4℃保存一周
试剂六	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	相当于 0.1 mg/mL 紫色没食子素溶液
定磷剂的配制：按 H ₂ O：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。

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
样本（ 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
样本（ μL ）	100	

混匀，8000g，25℃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
0.5 $\mu\text{mol/ml}$ 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：每小时每毫升血清（浆）中 $\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATP酶分解ATP产1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活力（ $\mu\text{mol/h/mL}$ ）= $[\text{C 标准管} \times \text{V 总}] \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{V 样} \div \text{T} = 7.5 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$

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1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

Ca⁺⁺ 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1 μmol 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：每小时每1万个细菌或细胞中Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP酶分解ATP产生1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP酶活力(μmol/h /10⁴cell)=[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，0.5 μmol/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。