

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

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。

需自备的仪器及用品：

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。

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	-

0.5 μmol/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H₂O：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。

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
0.5 μmol/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。

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。

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1 μmol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1 μmol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1 μmol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1 μmol无机磷的量为一个酶活力单位。

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶活力 (U/10⁴) = [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，0.5mL；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。