

## Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup>-ATP 酶活性检测试剂盒（微量法）

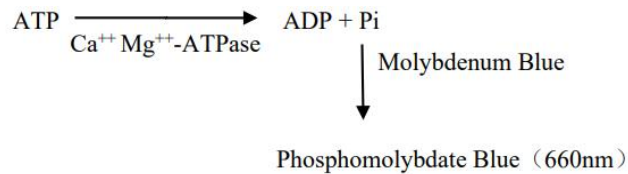
产品货号：BA1040

产品规格：100管/48样

### 产品说明：

Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup>-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。

Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup>-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。



**注意：**实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 产品内容：

| 试剂名称 | 规格        | 保存条件 |
|------|-----------|------|
| 试剂一  | 液体60mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂二  | 液体4mL×1瓶  | 2-8℃ |
| 试剂三  | 粉剂×2支     | -20℃ |
| 试剂四  | 液体2mL×1瓶  | 2-8℃ |
| 试剂五  | 液体3mL×1瓶  | 2-8℃ |
| 试剂六  | 粉剂×1瓶     | 2-8℃ |
| 试剂七  | 粉剂×1瓶     | 2-8℃ |
| 试剂八  | 液体5mL×1瓶  | 室温   |
| 标准品  | 液体1mL×1支  | 2-8℃ |

### 溶液的配制：

1. 试剂三：用时取1支加1mL蒸馏水，现用现配。用不完的试剂-20℃分装保存一周。
2. 试剂六：用时加入5mL蒸馏水，溶解后2-8℃保存两周。
3. 试剂七：用时加入5mL蒸馏水，溶解后2-8℃保存两周。
4. 标准品：10mmol/L标准磷贮备液。将标准品20倍稀释，即取0.1mL标准品加1.9mL蒸馏水充分混匀，配成0.5 μmol/mL标准磷应用液，现配现用。
5. 定磷剂的配制：按H<sub>2</sub>O：试剂六：试剂七：试剂八=2:1:1:1（体积比）的比例配制，配好的定磷剂应为浅黄色。若变色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂根据实验用量现用现配。
6. 注意：配试剂最好用新的烧杯、玻璃棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

### 操作步骤:

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）：

##### 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；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一，超声波破碎细菌或细胞（功率 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：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

##### 2. 血清（浆）样品：直接检测。

#### 二、测定步骤

##### 1. 可见分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 660nm，可见分光光度计需用蒸馏水调零。

##### 2. 酶促反应（在 EP 管中加入下列试剂）

| 试剂名称                              | 对照管 | 测定管 |
|-----------------------------------|-----|-----|
| 试剂一（ $\mu\text{L}$ ）              | 65  | 45  |
| 试剂二（ $\mu\text{L}$ ）              | 40  | 40  |
| 试剂三（ $\mu\text{L}$ ）              | 20  | 20  |
| 试剂四（ $\mu\text{L}$ ）              | -   | 20  |
| 样品（ $\mu\text{L}$ ）               | -   | 100 |
| 混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确水浴 10min |     |     |
| 试剂五（ $\mu\text{L}$ ）              | 25  | 25  |
| 样品（ $\mu\text{L}$ ）               | 100 | -   |
| 混匀，4000g，常温离心 10min，取上清液          |     |     |

##### 3. 定磷（在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂）

| 试剂名称   | 空白管 | 标准管 | 对照管 | 测定管 |
|--|-----|-----|-----|-----|
| 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 标准磷应用液（ $\mu\text{L}$ ）   | -   | 20  | -   | -   |
| 上清液（ $\mu\text{L}$ ）   | -   | -   | 20  | 20  |
| 蒸馏水（ $\mu\text{L}$ ）   | 20  | -   | -   | -   |
| 定磷试剂（ $\mu\text{L}$ ）  | 200 | 200 | 200 | 200 |
| 混匀，40℃ 水浴 10min，冷却至室温，在 660nm 处，记录各管吸光值。计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。每个测定管需设一个对照管，标准管和空白管只需测 1-2 次。 |     |     |     |     |

#### 三、Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup>-ATPase 活力的计算

##### 1. 血清（浆）Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup>-ATPase 活力的计算:

定义：规定每小时每毫升血清（浆）中Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup>-ATP酶分解ATP产生1 $\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP酶活力 (U/mL)} = \frac{C_{\text{标准管}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \div T}{= 7.5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}}$$

##### 2. 组织、细菌或细胞中Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup>-ATPase活力的计算:

###### (1) 按蛋白浓度计算:

定义：规定每小时每毫克组织蛋白中Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup>-ATP酶分解ATP产生1 $\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP酶活力 (U/mg prot)} = \frac{C_{\text{标准管}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T}{= 7.5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}}$$

###### (2) 按样本鲜重计算:

定义：规定每小时每克组织中Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup>-ATP酶分解ATP产生1 $\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。



扫一扫 加微信

**郑州乐业生物科技有限公司**

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

$$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP酶活力(U/g 质量)} = \text{C标准管} \times \Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准} \times \text{V总} \div (\text{V样} \div \text{V样总} \times \text{W}) \div \text{T} \\ = 7.5 \times \Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准} \div \text{W}$$

(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 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP}$ 酶分解ATP产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP酶活力(U/10}^4\text{ cell)} = \text{C标准管} \times \Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准} \times \text{V总} \div (\text{V样} \div \text{V样总} \times 500) \div \text{T} \\ = 0.015 \times \Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准}$$

C标准管: 标准管浓度,  $0.5\mu\text{mol/mL}$ ; V总: 酶促反应总体积,  $0.25\text{mL}$ ; V样: 加入样本体积,  $0.1\text{mL}$ ; V样总: 加入试剂一体积,  $1\text{mL}$ ; T: 反应时间,  $1/6$ 小时; Cpr: 样本蛋白质浓度,  $\text{mg/mL}$ ; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500万。

#### 注意事项:

1. 由于每一个样都必须做对照, 本试剂盒100管保证测48份 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP}$ 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com