

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶活性测定说明书

分光光度法 50 管/24 样

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。

试剂的组成和配制：

产品名称	OP001-50T/24S	Storage
提取液：液体	50ml	4℃
试剂一：液体	10ml	4℃
试剂二：液体	5ml	4℃
试剂三：液体	5ml	4℃
试剂四：粉剂	1 支×3	-20℃
试剂五：液体	5ml	4℃
试剂六：粉剂	1 瓶	4℃
试剂七：粉剂	1 瓶	4℃
试剂八：粉剂	1 瓶	4℃
试剂九：液体	25ml	室温
试剂十：10mmol/L 标准磷贮备液	10ml	4℃
说明书	一份	

试剂四：粉剂×3 支，-20℃保存。用时每支加 1ml 蒸馏水，现用现配；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

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；

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 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。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



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。

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。

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。

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、加样表（在 1.5ml 棕色 EP 管中按下表依次加样）；

试剂名称(μl)	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，25℃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。

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。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



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 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)

组织中 Ca⁺⁺ Mg⁺⁺- ATPase 的计算：

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。

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶活力(μmol/h/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单位。

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶活力(μmol/h/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(μmol/h /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，0.5μmol/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。

