

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶活性测定说明书

微量法 100 管/48 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	OP002-100T/48S	Storage
提取液：液体	100ml	4℃
试剂一：液体	10ml	4℃
试剂二：粉剂	1 瓶	-20℃
试剂三：液体	2ml	4℃
试剂四：粉剂	1 瓶	4℃
试剂五：粉剂	1 瓶	4℃
试剂六：粉剂	1 瓶	4℃
试剂七：液体	25ml	室温
试剂八：10mmol/L 标准磷贮备液	10ml	4℃
说明书	一份	

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 6ml 蒸馏水充分混匀待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

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；

0.5μmol/ml 标准磷应用液配制：将试剂八 20 倍稀释，即取 0.1ml 试剂八加 1.9ml 蒸馏水充分混匀；

定磷剂的配制：按 H₂O: 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。



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。

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
0.5μmol/ml 标准磷应用液 (μl)		20		
上清液 (μl)			20	20
蒸馏水 (μl)	20			

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 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。



Ca⁺⁺ Mg⁺⁺- ATPase 活力的计算:

1、血清 (浆) Ca⁺⁺ Mg⁺⁺- ATPase 活力的计算:

定义: 每小时每毫升血清 (浆) 中 Ca⁺⁺ Mg⁺⁺- ATP 酶分解 ATP 产生 1 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶活力 (μ mol/h/ml) = [C 标准管 \times V 总] \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div V 样 \div T=7.5 \times (A 测定管-A 对照管) \div (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 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶活力(μ mol/h / mg prot)=[C 标准管 \times V 总] \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div (V 样 \times Cpr) \div T=7.5 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div 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 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶活力(μ mol/h / g 鲜重)=[C 标准管 \times V 总] \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div (W \times V 样 \div V 样总) \div T=7.5 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div 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 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶活力(μ mol/h / 10⁴ cell)=[C 标准管 \times V 总] \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div (500 \times V 样 \div V 样总) \div T=0.015 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管)

C 标准管: 标准管浓度, 0.5 μ mol/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。

