



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP酶活性检测试剂盒(微量法)

货号: R41925

规格: 100T/48S

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液	60mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-A	10mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-B	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2-8℃保存一周;
试剂-C	2mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-D	粉剂×1瓶	2-8℃保存; 用时加入3mL蒸馏水, 2-8℃保存。
试剂-E	粉剂×1瓶	2-8℃保存; 用时加入5mL蒸馏水, 溶解后2-8℃保存一周。
试剂-F	粉剂×1瓶	2-8℃保存; 用时加入5mL蒸馏水, 溶解后2-8℃保存一周。
试剂-G	5mL×1瓶	室温保存。
试剂-标储	1mL×1瓶	10mmol/L标准磷贮备液, 2-8℃保存。
标准磷应用液 0.5μmol/mL:	试剂-标储20倍稀释, 即取0.1mL试剂-标储加1.9mL蒸馏水, 充分混匀即可。	
定磷剂的配制	按H ₂ O:试剂-E:试剂-F:试剂-G=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。	

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

简介



意义: $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -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。

原理: 根据 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/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 (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。

2. 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。

3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

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)

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)
试剂-A	65	45
试剂-B	60	60
试剂-C		20
样本		100
混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 准确水浴 10min		
试剂-D	25	25



样本	100	
混匀, 8000g, 25°C 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(μL)	标准管(μL)	对照管(μL)	测定管(μL)
标准磷应用液0.5μmol/mL		20		
上清液			20	20
蒸馏水	20			
定磷试剂	200	200	200	200
混匀, 室温放置30min, 在660nm处比色, 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。

$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活性计算公式:

1. 血清 (浆) $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活力的计算

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

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

2. 组织、细菌或细胞中 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活力的计算:

(1) 按蛋白浓度计算:

定义: 每小时每毫克组织蛋白中 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

(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 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

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

Ca^{++} Mg^{++} -ATP 酶活力 ($\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}$) = $[\text{C 标准管} \times \text{V 总}] \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div (500 \times \text{V 样} \div \text{V 样总}) \div \text{T} = 0.015 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$

注: C 标准管: 标准管浓度, $0.5\mu\text{mol/mL}$; V 总: 酶促反应总体积, 0.25mL ;
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。

源叶