

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ -ATP 酶检测试剂盒（分光光度法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

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；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

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。

0.5μmol/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。

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。

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)

	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。

计算公式:

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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

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。

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。