

使用说明书

Instruction Manual

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶活性检测试剂盒（微量法）

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATPase Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/48S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0040M-ES	60mL × 1 瓶	4℃保存。
CB0040M-A	10mL × 1 瓶	4℃保存。
CB0040M-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 4℃保存一周。
CB0040M-C	2mL × 1 瓶	4℃保存。
CB0040M-D	粉剂 × 1 瓶	4℃保存；用时加入 3mL 蒸馏水，4℃保存。
CB0040M-E	粉剂 × 1 瓶	4℃保存；用时加入 5mL 蒸馏水，溶解后 4℃保存一周。
CB0040M-F	粉剂 × 1 瓶	4℃保存；用时加入 5mL 蒸馏水，溶解后 4℃保存一周。
CB0040M-G	5mL × 1 瓶	室温保存。
CB0040M-标储	1mL × 1 瓶	10mmol/L 标准磷储备液，4℃保存。
标准磷应用液 (0.5 μmol/mL)	CB0040M-标储 20 倍稀释，即取 0.1mL CB0040M-标储加 1.9mL 蒸馏水，充分混匀即可。	
定磷剂的配制	按 H ₂ O：CB0040M-E：CB0040M-F：CB0040M-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。	

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、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。

二、样品酶液的制备：

- 细菌、细胞样品的制备：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）：CB0040M-ES 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL CB0040M-ES），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)：CB0040M-ES 体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0040M-ES），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。

三、测定步骤：

1. 分光光度计/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）：

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)
CB0040M-A	65	45
CB0040M-B	60	60
CB0040M-C		20
样本		100
混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确水浴 10min。		
CB0040M-D	25	25
样本	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）：

试剂名称	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：空白管和标准管只需要测定 1-2 次。

四、Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶活性计算公式：

1. 血清（浆）Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶活力的计算

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

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶活力 (U/ 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)

2. 组织、细菌或细胞中 Ca⁺⁺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 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 (U/mg prot) = [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 (U/g 鲜重) = [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。

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

注： C 标准管：标准管浓度，0.5μmol/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 CB0040M-ES 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. 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。
2. 由于每一个样都必须做对照，本试剂盒 100 管只能测 48 份 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP}$ 酶。
3. 本测定方法具有微量、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。
4. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

