

使用说明书

Instruction Manual

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶活性检测试剂盒（可见分光光度法）

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATPase Assay Kit (Visible Spectrophotometry)

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

50T/24S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0040V-ES	50mL ×1 瓶	4℃保存。
CB0040V-A	10mL ×1 瓶	4℃保存。
CB0040V-B	5mL ×1 瓶	4℃保存。
CB0040V-C	5mL ×1 瓶	4℃保存。
CB0040V-D	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 -20℃可保存一周。
CB0040V-E	5mL ×1 瓶	4℃保存。
CB0040V-F	粉剂 ×1 瓶	4℃保存；用时加入 3mL 蒸馏水，4℃保存。
CB0040V-G	粉剂 ×1 瓶	4℃保存；用时加入 25mL 蒸馏水，溶解后 4℃保存一周。
CB0040V-H	粉剂 ×1 瓶	4℃保存；用时加入 25mL 蒸馏水，溶解后 4℃保存一周。
CB0040V-I	25mL ×1 瓶	室温保存。
CB0040V-标储	1mL ×1 瓶	10mmol/L 标准磷储备液，4℃保存。
标准磷应用液 (0.5μmol/mL)	CB0040V-标储 20 倍稀释，即取 0.1mL CB0040V-标储加 1.9mL 蒸馏水，充分混匀即可。	
定磷剂的配制：	按 H ₂ O：CB0040V-G：CB0040V-H：CB0040V-I = 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、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。

二、样品酶液的制备：

1. 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（ 10^4 个）：CB0040V-ES 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL CB0040V-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）：CB0040V-ES 体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0040V-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)
CB0040V-A	130	90
CB0040V-B	40	40
CB0040V-C	40	40
CB0040V-D	40	40
CB0040V-E		40
样本		200
混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确水浴 10min。		
CB0040V-F	50	50
样本	200	
混匀，8000g，25℃离心 10min，取上清液。		

3. 定磷（1.5mL EP 管中依次加入下列试剂）：

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 0.5 μ mol/mL		100		
上清液			100	100
蒸馏水	100			
定磷试剂	1000	1000	1000	1000
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：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 (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) = [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 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

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

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

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, 0.5mL ; V 样: 加入样本体积, 0.2mL ; V 样总: 加入 CB0040V-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 50 管只能测 24 份 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -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。

