

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺- ATP 酶活性测定说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：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。

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。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 100mL ×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

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。

试剂三：液体 2mL×1 瓶，4℃ 保存。

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。

试剂七：液体 25mL×1 瓶，室温保存。

试剂八：10mmol/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。

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
0.5 $\mu\text{mol/ml}$ 标准磷应用液（ μL ）		20		
上清液（ μL ）			20	20
蒸馏水（ μL ）	20			
定磷试剂（ μL ）	200	200	200	200

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 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -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。

$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATPase 活力的计算:

- 1、血清（浆） $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATPase 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 1 μmol 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 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -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 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 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 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

- (3) 按细菌或细胞密度计算:

定义：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 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

$\div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.015 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}})$

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。