

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: BC0960

规格: 50T/24S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 4 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂四	液体 2 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 3 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂六	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂七	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂八	液体 15 mL×1 瓶	常温保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

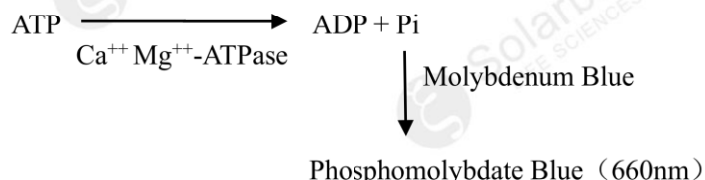
溶液的配制:

- 1、试剂三: 临用前取 1 支加入 1 mL 蒸馏水充分混匀待用; 现用现配。用不完的试剂-20℃分装保存一周。
- 2、试剂六: 临用前加入 15 mL 蒸馏水, 溶解后 2-8℃保存两周。
- 3、试剂七: 临用前加入 15 mL 蒸馏水, 溶解后 2-8℃保存两周。
- 4、标准品: 10mmol/L 标准磷贮备液。将标准品 20 倍稀释, 即取 0.1 mL 标准品加 1.9 mL 蒸馏水充分混匀, 配成 0.5 μmol/mL 标准磷应用液, 现用现配。
- 5、定磷剂的配制: 按 H₂O: 试剂六: 试剂七: 试剂八=2:1:1:1 (体积比) 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, 定磷剂根据样本量现用现配。

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。

产品说明:

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。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。



注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品:





可见分光光度计、水浴锅/恒温培养箱、低温离心机、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一，超声波破碎细菌或细胞（功率 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：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

血清（浆）样本：直接检测。

二、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	测定管
试剂一（μL）	130	90
试剂二（μL）	80	80
试剂三（μL）	40	40
试剂四（μL）	-	40
样本（μL）	-	200
混匀，37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）准确水浴10min		
试剂五（μL）	50	50
样本（μL）	200	-
混匀，4000g，常温离心10min，取上清液		

3、定磷（1.5mLEP管中依次加入下列试剂）

试剂名称	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，40℃水浴10 min，冷却至室温，在660nm处测定吸光值。计算ΔA测定=A测定管-A对照管，ΔA标准=A标准管-A空白管。每个测定管需设一个对照管，标准管和空白管只需测1-2次。				

三、Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP酶活力的计算

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×ΔA测定÷ΔA标准×V总÷V样×T×F

=7.5×ΔA测定÷ΔA标准×F

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

$$\begin{aligned}\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP酶活力(U/mg prot)} &= \text{C标准管} \times \Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准} \times \text{V总} \div (\text{Cpr} \times \text{V样}) \div \text{T} \times \text{F} \\ &= 7.5 \times \Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准} \div \text{Cpr} \times \text{F}\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算:

定义: 规定每小时每克组织中 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP酶分解ATP产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP酶活力(U/g 质量)} &= \text{C标准管} \times \Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准} \times \text{V总} \div (\text{V样} \div \text{V样总} \times \text{W}) \div \text{T} \times \text{F} \\ &= 7.5 \times \Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准} \div \text{W} \times \text{F}\end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞数量计算:

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。

$$\begin{aligned}\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP酶活力(U/10}^4\text{ cell)} &= \text{C标准管} \times \Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准} \times \text{V总} \div (\text{V样} \div \text{V样总} \times \text{N}) \div \text{T} \times \text{F} \\ &= 7.5 \times \Delta\text{A测定} \div \Delta\text{A标准} \div \text{N} \times \text{F}\end{aligned}$$

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: 样本质量, g; N: 细菌或细胞总数, 以万计; F: 样本稀释倍数。

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 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -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。

实验实例:

- 1、取 0.1g 胰腺加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。 8000g 4°C 离心 10min , 取上清置冰上, 按照测定步骤操作, 测得
计算 $\Delta\text{A 测定} = 0.916 - 0.389 = 0.527$, $\Delta\text{A 标准} = 0.398 - 0.004 = 0.394$, 按样本质量计算酶活得:
 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP 酶活力(U/g 质量)} = 7.5 \times \Delta\text{A 测定} \div \Delta\text{A 标准} \div \text{W} = 100.32 \text{ U/g 质量}$ 。
- 2、取 0.1g 柳树加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。 8000g 4°C 离心 10min , 取上清置冰上, 按照测定步骤操作, 测得
计算 $\Delta\text{A 测定} = 0.137 - 0.124 = 0.013$, $\Delta\text{A 标准} = 0.398 - 0.004 = 0.394$, 按样本质量计算酶活得:
 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP 酶活力(U/g 质量)} = 7.5 \times \Delta\text{A 测定} \div \Delta\text{A 标准} \div \text{W} = 2.47 \text{ U/g 质量}$ 。

相关发表文献:

- [1] Chen T, Zhao MX, Tang XY, Wei WX, Wen X, Zhou SZ, Ma BH, Zou YD, Zhang N, Mi JD, Wang Y, Liao XD, Wu YB. The tetracycline resistance gene tetX has an expensive fitness cost based on increased outer membrane permeability and metabolic burden in Escherichia coli. J Hazard Mater. 2023 Sep 15;458:131889. doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.131889. Epub 2023 Jun 19. PMID: 37348375.
- [2] Sun J, Chen Y, Wang T, Ali W, Ma Y, Yuan Y, Gu J, Bian J, Liu Z, Zou H. Cadmium promotes nonalcoholic fatty liver disease by inhibiting intercellular mitochondrial transfer. Cell Mol Biol Lett. 2023 Oct 27;28(1):87. doi: 10.1186/s11658-023-00498-x. PMID: 37884867; PMCID: PMC10604759.





- [3] Zhang W, Chen R, Xu K, Guo H, Li C, Sun X. Protective effect of Xinmai'an tablets via mediation of the AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Phytomedicine*. 2023 Nov;120:155034. doi: 10.1016/j.phymed.2023.155034. Epub 2023 Aug 16. PMID: 37611465.
- [4] Gao H, Li Z, Cheng C, Cui J, Peng J, Wang X, Zhang M, Hou Y, Bai G. Fuziline Ameliorates Glucose and Lipid Metabolism by Activating Beta Adrenergic Receptors to Stimulate Thermogenesis. *Int J Mol Sci*. 2023 May 6;24(9):8362. doi: 10.3390/ijms24098362. PMID: 37176069; PMCID: PMC10179377.
- [5] Zhang W, Li B, Lv Y, Wei S, Zhang S, Hu Y. Transcriptomic analysis shows the antifungal mechanism of honokiol against *Aspergillus flavus*. *Int J Food Microbiol*. 2023 Jan 2;384:109972. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109972. Epub 2022 Oct 12. PMID: 36279642.

参考文献:

- [1] Datiles M J, Johnson E A, McCarty R E. Inhibition of the ATPase activity of the catalytic portion of ATP synthases by cationic amphiphiles[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2008, 1777(4): 362-368.

相关系列产品:

BC0060/BC0065 Na^+K^+ -ATP 酶活性检测试剂盒

BC0300/BC0305 ATP 含量检测试剂盒



本产品仅供科学研究使用。请勿用于临床、诊断、食品、化妆品检测等用途。

For research use only. Do not use for clinical, diagnostic, food, cosmetic testing and other purposes.