

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC0965

规格: 100T/48S

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 60 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 5 mL×1 瓶	常温保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

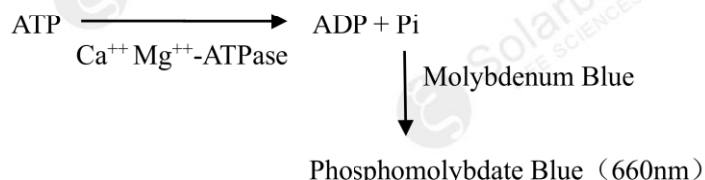
溶液的配制:

- 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: 临用时加入 5 mL 蒸馏水, 溶解后 2-8℃保存两周。
- 3、试剂七: 临用时加入 5 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) 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、玻璃棒和玻璃移液器, 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/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、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、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至660nm，可见分光光度计需用蒸馏水调零。

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）	65	45
试剂二（μL）	40	40
试剂三（μL）	20	20
试剂四（μL）	-	20
样本（μL）	-	100
混匀，37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）准确水浴10min		
试剂五（μL）	25	25
样本（μL）	100	-
混匀，4000g，常温离心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	标准管	对照管	测定管
0.5μmol/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，40℃水浴10min，冷却至室温，在 660nm处，记录各管吸光值。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酶活性的计算

1、血清（浆）Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP酶活性的计算：

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性单位。

$$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP酶活性(U/mL)} = \frac{\text{C标准管} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \div T \times F}{= 7.5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F}$$

2、组织、细菌或细胞中Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP酶活性的计算：

（1）按蛋白浓度计算：

定义：规定每小时每毫克组织蛋白中Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP酶分解ATP产生1μmol无机磷的量为一个酶活性单位。



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

(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性单位。

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

(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性单位。

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

C标准管: 标准管浓度, $0.5\mu\text{mol/mL}$; $V_{\text{总}}$: 酶促反应总体积, 0.25mL ; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1mL ; $V_{\text{样总}}$: 加入试剂一体积, 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 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。

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, 使用 96 孔板测得 $\Delta A_{\text{测定}} = 0.535 - 0.238 = 0.297$, $\Delta A_{\text{标准}} = 0.280 - 0.043 = 0.237$, 按样本质量计算酶活得:
 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP酶活性(U/g 质量)} = 7.5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 93.99 \text{ U/g 质量}$ 。
- 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, 使用 96 孔板测得 $\Delta A_{\text{测定}} = 0.105 - 0.099 = 0.006$, $\Delta A_{\text{标准}} = 0.280 - 0.043 = 0.237$, 按样本质量计算酶活得:
 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATP酶活性(U/g 质量)} = 7.5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 1.90 \text{ U/g 质量}$ 。

相关发表文献:

- [1] Sun J, Qu H, Ali W, Chen Y, Wang T, Ma Y, Yuan Y, Gu J, Bian J, Liu Z, Zou H. Co-exposure to cadmium and microplastics promotes liver fibrosis through the hemichannels -ATP-P2X7 pathway. Chemosphere. 2023 Dec;344:140372. doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.140372. Epub 2023 Oct 4. PMID: 37802476.
- [2] Chen HX, Wang XC, Hou HT, Wang J, Yang Q, Chen YL, Chen HZ, He GW. Lysine crotonylation of SERCA2a correlates to cardiac dysfunction and arrhythmia in Sirt1 cardiac-specific knockout mice. Int J Biol Macromol. 2023 Jul 1;242(Pt 4):125151. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125151. Epub 2023 Jun 1. PMID: 37270127.
- [3] Li L, Qi Q, Zhang H, Dong Q, Iqbal A, Gui H, Kayoumu M, Song M, Zhang X, Wang X. Ameliorative Effects of Silicon against Salt Stress in Gossypium hirsutum L. Antioxidants (Basel). 2022 Aug 4;11(8):1520. doi: 10.3390/antiox11081520. PMID: 36009240; PMCID: PMC9404900.





- [4] Wang L, Li A, Fang J, Wang Y, Chen L, Qiao L, Wang W. Enhanced Cell Wall and Cell Membrane Activity Promotes Heat Adaptation of *Enterococcus faecium*. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 23;24(14):11822. doi: 10.3390/ijms241411822. PMID: 37511581; PMCID: PMC10380804.
- [5] Sun J, Yu F, Wang T, Bian J, Liu Z, Zou H. The role of DRP1- PINK1-Parkin-mediated mitophagy in early cadmium-induced liver damage. *Toxicology*. 2022 Jan 30;466:153082. doi: 10.1016/j.tox.2021.153082. Epub 2021 Dec 21. PMID: 34952138.

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

