



$\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ - ATP 酶活性检测试剂盒
 $\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ - ATPase Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ - ATP 酶活性检测试剂盒

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ - ATPase Activity Assay Kit

一、产品描述

ATP 酶广泛分布于植物、动物、微生物和细胞的生物膜酶系统中，具有载体和酶的功能，可以维持细胞膜电位和调节渗透压，并为营养物质的吸收提供动力，对维持细胞正常生理功能起着极其重要的作用，并且可作为细胞能量代谢及功能有无损伤的重要评价指标。

Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶能够分解 ATP 生成 ADP 和无机磷，无机磷在酸性条件下能够与钼酸铵反应生成磷钼酸铵，经还原后生成蓝色磷钼蓝，产物在 660 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值的变化即可表征 Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-ATP 酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 80 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 5 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂三	粉剂×3 支	-20°C 保存	使用前每支加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C 可保存一周，避免反复冻融)
试剂四	液体 2 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂五	粉剂×2 瓶	4°C 避光保存	使用前每瓶加入 3 mL 蒸馏水充分溶解 (现用现配，配置后 4°C 可保存一周)
试剂六	粉剂×2 瓶	4°C 避光保存	使用前每瓶加入 3 mL 蒸馏水充分溶解 (现用现配，配置后 4°C 可保存一周)
试剂七	粉剂×2 瓶	4°C 避光保存	使用前每瓶加入 3 mL 蒸馏水充分溶解 (现用现配，配置后 4°C 可保存一周)
试剂八	液体 6 mL×1 瓶	4°C 保存	-
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C 保存	10 μmol/mL 磷标准液
标准应用液的制备：将 10 μmol/mL 磷标准液使用蒸馏水稀释 20 倍即为 0.5 μmol/mL 标准应用液。 (吸取 50 μL 10 μmol/mL 磷标准液加入 950 μL 蒸馏水，充分混匀即可)			

定磷剂的配制(根据使用量现用现配)：按试剂六：试剂七：试剂八：H₂O=1:1:1:2的体积比配制。

定磷剂正常应为浅黄色，若无色则试剂失效，若蓝色则为磷污染。

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 试剂一）处理样品，冰浴超声破碎（功率 200 W 或 20%，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 660 nm，蒸馏水调零。

②在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μ L)	对照组 (μ L)	标准组 (μ L)	空白组 (μ L)
试剂一	45	65	-	-
试剂二	40	40	-	-
试剂三	20	20	-	-
试剂四	20	-	-	-
粗酶液	100	-	-	-
37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确反应 10 min				
试剂五	25	25	-	-
粗酶液	-	100	-	-
充分混匀，8000 g 常温离心 10 min，取上清液				
在 96 孔板或离心管中加入下列试剂：				
上清液	20	20	-	-
标准应用液	-	-	20	-
蒸馏水	-	-	-	20
定磷剂	200	200	200	200
充分混匀，40℃显色 10 min，冷却至室温				

吸光值测定：测定 660 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白，计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照， ΔA 标准 = A 标准 - A 空白。注：空白组只需测定 1-2 次，每个样品均需设一个对照组。

3. $\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATP 活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每小时生成 1 μmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}\text{-ATPase (U/mg prot)} = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测定} \times V \text{ 酶促}}{\Delta A \text{ 标准} \times C_{\text{pr}} \times V \text{ 样} \times T} = \frac{7.5 \times \Delta A \text{ 测定}}{C_{\text{pr}} \times \Delta A \text{ 标准}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每小时生成 1 μmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}\text{-ATPase (U/g)} = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测定} \times V \text{ 酶促} \times V \text{ 样总}}{\Delta A \text{ 标准} \times W \times V \text{ 样} \times T} = \frac{7.5 \times \Delta A \text{ 测定}}{W \times \Delta A \text{ 标准}}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每小时生成 1 μmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}\text{-ATPase (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测定} \times V \text{ 酶促} \times V \text{ 样总}}{\Delta A \text{ 标准} \times \text{细菌或细胞数量} \times V \text{ 样} \times T} = \frac{7.5 \times \Delta A \text{ 测定}}{\text{细菌或细胞数量} \times \Delta A \text{ 标准}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每小时生成 1 μmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}\text{-ATPase (U/mL)} = \frac{C \text{ 标} \times \Delta A \text{ 测定} \times V \text{ 酶促}}{\Delta A \text{ 标准} \times V \text{ 样} \times T} = \frac{7.5 \times \Delta A \text{ 测定}}{\Delta A \text{ 标准}}$$

注释：C 标：标准应用液浓度，0.5 $\mu\text{mol/mL}$ ；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.1 mL；V 酶促：酶促反应总体积，0.25 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，10 min=1/6 h。

四、注意事项

- ①测定所用器皿要求严格无磷，最好使用新的玻璃器皿或一次性塑料器皿，避免磷污染；
- ②试剂三、五、六、七配置后有效期较短，为便于试验安排，均附赠一组作为备用；
- ③为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

