

## Ca<sup>2+</sup>Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHG5-M48	Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup> -ATP 酶活性检测试剂盒说明书	48T	微量法
PMHG5-M96		96T	

### 一、测定意义：

ATP 酶可分解 ATP 生成 ADP 及无机磷，测定无机磷的量可判断 ATP 酶活力的高低。

### 二、测定原理：

ATP 酶存在于组织细胞膜及细胞器膜上，是生物膜上的一种蛋白酶，它在物质运送、能量转换以及信息传递方面具有重要的作用。

### 三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
试剂一	液体 5mL×1 瓶	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 5mL×1 瓶	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 5mL×1 瓶	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 5mL×1 瓶	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	粉剂 ×1 支	粉剂×2 支	-20℃保存
用时每瓶粉剂加 0.5ml 双蒸水，现用现配。使用后剩余试剂-20℃以下可保存一周。			
试剂六	粉剂 ×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存
用时每瓶粉剂加 5ml 双蒸水，现用现配。使用后剩余试剂-20℃以下可保存一周。			
试剂七	液体 5mL×1 瓶	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂八	粉剂 ×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
用时每瓶加双蒸水 10mL 溶解，室温保存 3 个月。			
试剂九	粉剂 ×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
用时每瓶加双蒸水 10mL 溶解，溶解后避光 4℃可保存一周。			
试剂十	液体 5mL×1 瓶	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
定磷剂的配制：现用现配，按双蒸水:试剂八:试剂九:试剂十=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。			
10μmol/mL 标品	1ml×1 管	1ml×2 管	-20℃保存

### 四、操作步骤：

#### 样本前处理

- 1、组织：按照组织质量（g）:提取液(mL)为1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。
- 2、细菌、细胞：按照细胞数量  $10^4$  个: 提取液体积（mL）500~1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3 min），5000 rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

### 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. 测定前将试剂恢复至常温；
3. 将10 $\mu$ mol/mL标准品用双蒸水稀释至1 $\mu$ mol/mL，备用；
4. 操作表：
  - (1) 酶促反应：

	测定管	对照管
试剂一（ $\mu$ L）	40	30
试剂二（ $\mu$ L）	40	40
试剂三（ $\mu$ L）	-	10
试剂四（ $\mu$ L）	10	10
试剂五（ $\mu$ L）	-	10
试剂六（ $\mu$ L）	10	10
样品（ $\mu$ L）	100	-
混合均匀，37℃ 水浴 20min。		
试剂七（ $\mu$ L）	50	50
样品（ $\mu$ L）	-	100

- (2) 显色反应：

	测定管	对照管	空白管	标准管
1 $\mu$ mol/mL 标准液（ $\mu$ L）	-	-	-	20
上清液（ $\mu$ L）	20	20	-	-
水（ $\mu$ L）	-	-	20	-
定磷试剂（ $\mu$ L）	200	200	200	200
空白与标曲点做 2~3 个即可。混匀，45℃孵育 20min，冷却至室温后，空白管调零，于波长 660nm 测定各管吸光度。 $\Delta A = A_{\text{测试}} - A_{\text{对照}}$				

### 四、Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性计算：

## 1、Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性计算

### (1) 按样本鲜重计算：

**单位定义：**每分钟每克组织消耗 ATP 产生 1 $\mu$ mol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。

$$\text{ATP 酶活力 (U/g 质量)} = \frac{C_{\text{标}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{总}}}{(V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T}$$

### (2) 按样本蛋白浓度计算：

**单位定义：**每分钟每毫克蛋白分解 ATP 产生 1 $\mu$ mol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。

$$\text{ATP 酶活力 (U/mg prot)} = \frac{C_{\text{标}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{总}}}{(C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T}$$

### (3) 按细菌或细胞数量计算：

**单位定义：**每分钟每 1 万个细菌或细胞中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 $\mu$ mol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。

$$\text{ATP 酶活力 (U/10<sup>4</sup> cell)} = \frac{C_{\text{标}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{总}}}{(V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T}$$

**C 标：**标准管浓度，1 $\mu$ 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，20min；

**Cpr：**样本蛋白质浓度，mg/mL；

**W：**样本质量，g；

**500：**细菌或细胞总数，500 万。

## 五、 注意事项：

1、实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测；