

Ca²⁺-ATP 酶活性测定说明书

(货号: G0860W 微板法 48 样)

一、产品简介:

Ca²⁺是细胞内重要的信号分子,细胞质基质始终维持在一个较低水平的 Ca²⁺浓度, Ca²⁺浓度的维持主要由 Ca²⁺-ATP 酶来维持,该酶可催化 ATP 水解生成 ADP 和无机磷。通过测定无机磷的量来确定该酶活性高低。

二、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

三、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	提取液 80mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4℃ 保存	使用前甩几下使试剂落入底部,再加 8mL 提取液,混匀溶解备用。
试剂二	粉体×1 瓶	-20℃ 保存	使用前甩几下使试剂落入底部,再加 15mL 提取液,混匀溶解备用。
试剂三	液体 4mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 2mL×1 瓶	4℃ 保存	临用前在试剂 A 中加 1.8mL 的 B 液,再加 23.2mL 的蒸馏水,混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲,则用到该试剂

【注】: 全程操作需无磷环境;试剂配置最好用新的枪头和玻璃移液器等,也可以用一次性塑料器皿,避免磷污染。

四、Ca²⁺-ATP 酶活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】: 若增加样本量,可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 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 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);12000rpm 4℃ 离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】: 若增加样本量,可按照细菌/细胞数量(10⁴): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测;若浑浊,离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 700nm,所有试剂解冻至室温(25℃)。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	100	
提取液		100
样本	100	
试剂二	100	100

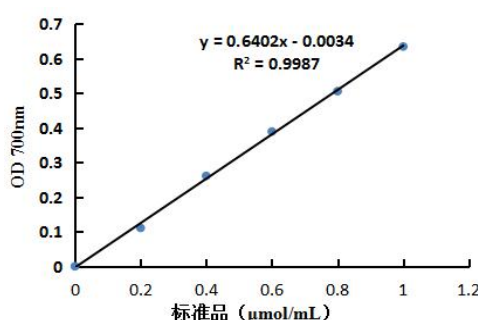
37℃ 孵育 20min		
试剂三	40	40
样本		100
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测		

③ 显色反应：

上清液	50	50
试剂四	200	200
混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.6402x - 0.0034$ ， x 是标准品摩尔质量（ $\mu\text{mol/mL}$ ）， y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 15.93 \times (\Delta A + 0.0034) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 15.93 \times (\Delta A + 0.0034) \div W\end{aligned}$$

4、按细菌或细胞密度计算：

定义：每小时每 1 万个细菌或细胞分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.032 \times (\Delta A + 0.0034)$$

5、液体中 Ca^{2+} -ATPase 活力计算：

定义：每小时每毫升液体分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V_2] \div V_1 \div T = 15.93 \times (\Delta A + 0.0034)$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.1mL；

V2---酶促反应总体积，0.34mL；

T---反应时间，1/3 小时；

W---样本鲜重，g；

500---细菌或细胞总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（ $5\mu\text{mol/mL}$ ）：标准品用 10mL 试剂一溶解。（母液需在两天内用）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。