

## 超微量 $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ - ATP 酶测试盒

比色法 50 管/25 样

### 一、测定原理：

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、试剂组成与配制：

|                                                                                                                                                                           | 组份              |           |           | 保存          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|-----------|-------------|
| 试剂一                                                                                                                                                                       | 液体              | 13ml×1 瓶  | 13ml×2 瓶  | 4℃保存 6 个月   |
| 试剂二                                                                                                                                                                       | 液体              | 4ml×1 瓶   | 4ml×2 瓶   | 4℃保存 6 个月   |
| 试剂三                                                                                                                                                                       | 粉剂              | 粉剂×4 支    | 粉剂×8 支    | -20℃保存 6 个月 |
| 试剂三的配制：用时每支试剂三粉剂加双蒸水 1ml，充分溶解。（用不完-20℃以下可保存一周。）                                                                                                                           |                 |           |           |             |
| 试剂四                                                                                                                                                                       | 液体              | 5ml×1 瓶   | 5ml×2 瓶   | 4℃保存 6 个月   |
| 试剂五                                                                                                                                                                       | 甲液              | 7ml×4 瓶   | 7ml×8 瓶   | 4℃保存 6 个月   |
|                                                                                                                                                                           | 乙液              | 6ml×4 瓶   | 6ml×8 瓶   | 4℃避光保存 6 个月 |
| [注]：试剂五乙液在冬天或 4℃长时间保存时可能会出现凝胶状物质，37℃溶解不了，可将其 60℃左右水浴 10 分钟即可完全溶解；甲液、乙液应防止磷污染。                                                                                             |                 |           |           |             |
| 试剂六                                                                                                                                                                       | 液体              | 50ml×1 瓶  | 50ml×2 瓶  | 室温保存 6 个月   |
| 试剂七                                                                                                                                                                       | 10mmol/L 标准磷贮备液 | 5ml×1 瓶   | 5ml×1 瓶   | 4℃保存 6 个月   |
| 试剂八                                                                                                                                                                       | 液体              | 4ml×1 瓶   | 4ml×2 瓶   | 4℃保存 6 个月   |
| 试剂九                                                                                                                                                                       | 粉剂              | 粉剂×4 支    | 粉剂×8 支    | 4℃保存 6 个月   |
|                                                                                                                                                                           | 稀释液             | 0.5ml×4 支 | 0.5ml×8 支 | 4℃保存 6 个月   |
| 试剂九的配制：用时取一支试剂九稀释液加入一支试剂九粉剂中，充分混匀，用不完的 4℃保存。                                                                                                                              |                 |           |           |             |
| 双蒸水                                                                                                                                                                       |                 | 40ml×1 瓶  | 40ml×1 瓶  | 4℃或室温保存     |
| 0.1 $\mu\text{mol/ml}$ 标准磷应用液的配制：用时将 10mmol/L 磷贮备液 100 倍稀释，即取 0.1ml 加双蒸水至 10ml。                                                                                           |                 |           |           |             |
| 0.02 $\mu\text{mol/ml}$ 磷标准液的配制：用时将 0.1 $\mu\text{mol/ml}$ 磷标准液用双蒸水 5 倍稀释，即取 0.1 $\mu\text{mol/ml}$ 磷标准液 1ml 加双蒸水 4ml。                                                    |                 |           |           |             |
| 基质液的配制：按试剂一：试剂二：试剂三=260：80：80 比例混合。需多少配多少，现用现配。                                                                                                                           |                 |           |           |             |
| 显色剂的配制：用时取一瓶试剂五甲液加入一瓶已预温好试剂五乙液中，充分混匀，需提前 0.5 小时配制，2~8℃条件下至少可保存 5 天，配好的显色剂的量够做 13 个管子（如果你的样本量很少所需的显色剂的量较少，那么你可以按试剂五中的甲液：乙液=7：6 的比例自行配制显色剂，需多少配多少（按比例配制显色剂时要防止磷污染，最好用专用吸嘴）。 |                 |           |           |             |

### 三、样本的前处理：

样本处理详见说明书或本公司官网-技术文章部分关于样本处理的说明。测定组织和细胞同时需要测定蛋白浓度。可用总蛋白定量测试盒（考马斯亮蓝法）或者总蛋白定量测试盒(BCA 法)进行蛋白浓度的测定。

### 四、操作步骤：

#### 1、酶促反应：

|                            | 对照管  | Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup> -ATPase 测定管 |
|----------------------------|------|-----------------------------------------------|
| 双蒸水 (ml)                   | 0.16 |                                               |
| 样本 (ml)                    |      | 0.1                                           |
| 试剂八 (ml)                   |      | 0.08                                          |
| 试剂九 (ml)                   |      | 0.08                                          |
| 试剂一 (ml)                   | 0.26 | 0.26                                          |
| 试剂二 (ml)                   | 0.08 | 0.08                                          |
| 试剂三 (ml)                   | 0.08 | 0.08                                          |
| 混匀，37℃准确反应 10 分钟，          |      |                                               |
| 试剂四 (ml)                   | 0.1  | 0.1                                           |
| 样本 (ml)                    | 0.1  |                                               |
| 混匀，3500 转/分，离心 10 分钟，取上清定磷 |      |                                               |

#### 2、定磷：（0.02 μmol/ml 磷标准液及显色剂的配制见第一页）

|                                              | 空白管 | 标准管 | 对照管 | Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup> -ATPase 测定管 |
|----------------------------------------------|-----|-----|-----|-----------------------------------------------|
| 双蒸水 (ml)                                     | 0.3 |     |     |                                               |
| 0.02 μmol/ml 磷标准液 (ml)                       |     | 0.3 |     |                                               |
| 上清液 (ml)                                     |     |     | 0.3 | 0.3                                           |
| 试剂五显色剂 (ml)                                  | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0                                           |
| 混匀，室温静置 2 分钟                                 |     |     |     |                                               |
| 试剂六 (ml)                                     | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0                                           |
| 混匀，室温静置 5 分钟，在 636nm 处，1cm 光径，双蒸水调零，测各管吸光度值。 |     |     |     |                                               |

### 五、计算公式：

1、定义：规定每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔磷/毫克蛋白/小时 (μmolPi/mgprot/hour)。

## 2、计算公式：

$$\text{组织、细胞中 } Ca^{2+} Mg^{2+} - \text{ATPase 活力}(U / mgprot) = \frac{\text{测定 } OD \text{ 值} - \text{对照 } OD \text{ 值}}{\text{标准 } OD \text{ 值} - \text{空白 } OD \text{ 值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(0.02 \mu mol / ml)} \times 6^* \times 7.8^{**} \div \frac{\text{待测样本蛋白}}{\text{浓度}(mgprot / ml)}$$

[注]：6\*：定义为每小时，实际操作为 10 分钟反应，所以必须乘以 6。

7.8\*\*：反应体系中 7.8 倍稀释。