

Ca²⁺-ATP 酶试剂盒

微板法 48 样

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。

试剂盒组成和配制

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 80mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	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	液体 4mL×1 瓶	-20℃保存	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。

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。

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(10^4)：提取液(mL)为 500~1000：1 的比例进行提取。

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		

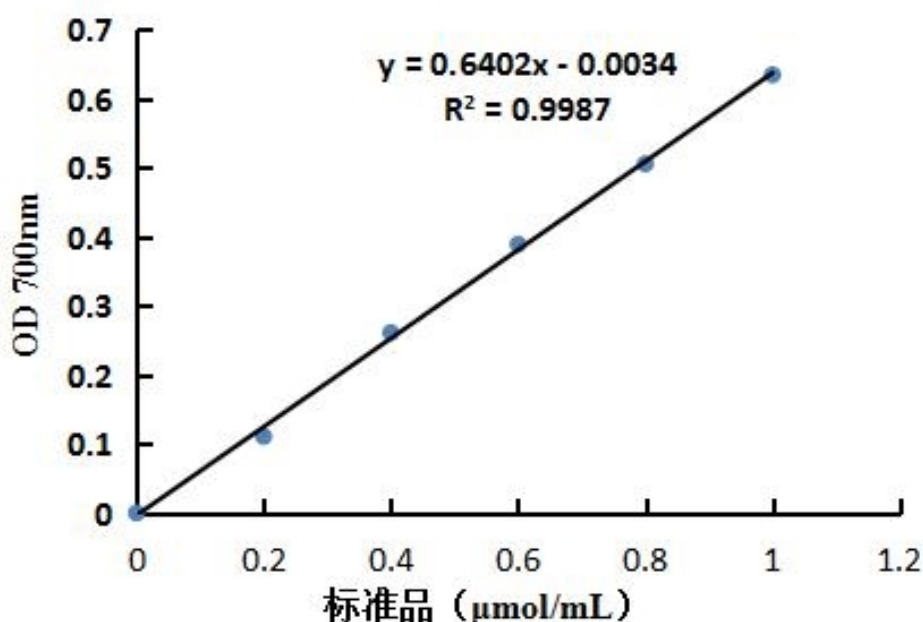
③ 显色反应：

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）。		

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 (μmol/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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot})=[(\Delta A+0.0034)\div 0.6402\times V2]\div (V1\times Cpr)\div T$$

$$=15.93\times (\Delta A+0.0034)\div Cpr。$$

3、按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重})=[(\Delta A+0.0034)\div 0.6402\times V2]\div (W\times V1\div V)\div T$$

$$=15.93\times (\Delta A+0.0034)\div W。$$

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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0034)\div 0.6402\times V2]\div (500\times V1\div V)\div T=0.032\times (\Delta$$

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。

酶活力($\mu\text{mol/h/mL}$)= $[(\Delta A+0.0034)\div 0.6402\times V2]\div V1\div T=15.93\times(\Delta A+0.0034)$

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。