Ca^{2+}- ATP 酶活性测定说明书

（货号：G0860F 分光法 24 样）

一、产品简介：

Ca^{2+}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Ca^{2+}浓度，Ca^{2+}浓度的维持主要由Ca^{2+}-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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、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 60mL×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	粉体×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 3mL×1 瓶	4℃保存	临用前试剂 A 中加 2.9mL 的 B 液，再加 37.1mL 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、Ca^{2+}-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。

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 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 700nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
试剂一	200	
提取液		200

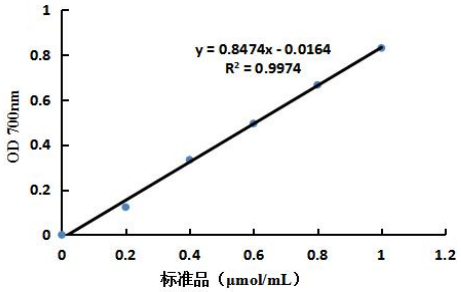
样本	200	
试剂二	200	200
37℃ 孵育 20min		
试剂三	80	80
样本		200
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测		

④ 显色反应：

上清液	150	150
试剂四	600	600
混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值， △A=A 测定-A 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 =0.8474x - 0.0164，x 是标准品摩尔质量（μmol/mL）, y 是△A。



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。

酶活力(μmol/h/mg prot)= [(△A+0.0164)÷0.8474×V2] ÷（V1×Cpr）÷T

=12.04×(△A+0.0164)÷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。

酶活力(μmol/h/g 鲜重)= [(△A+0.0164)÷0.8474×V2]÷(W× V1÷V)÷T

=12.04×(△A+0.0164)÷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。

酶活力(μmol/h /10^4 cell)= [(△A+0.0164)÷0.8474×V2]÷(500×V1÷V)÷T

=0.024×(△A+0.0164)

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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力（μmol/h/mL）=[(△A+0.0164)÷0.8474×V2]÷V1÷T=12.04×(△A+0.0164)

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入样本体积，0.2mL ；

V2---酶促反应总体积，0.68mL； T---反应时间，1/3 小时；

W---样本鲜重，g； 500---细菌或细胞总数，500 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（5μmol/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. μmol/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。