

# Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶试剂盒

微板法 48 样

## 产品简介:

Ca<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>浓度, Ca<sup>2+</sup>浓度的维持主要由 Ca<sup>2+</sup>-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。

## 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。

## 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 80 mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4°C 保存	用前用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°C 保存	用前用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°C 保存	
试剂四	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 2mL×1 瓶	4°C 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°C 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。

## Ca<sup>2+</sup> - 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°C×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°C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<sup>4</sup>)：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°C）。

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	

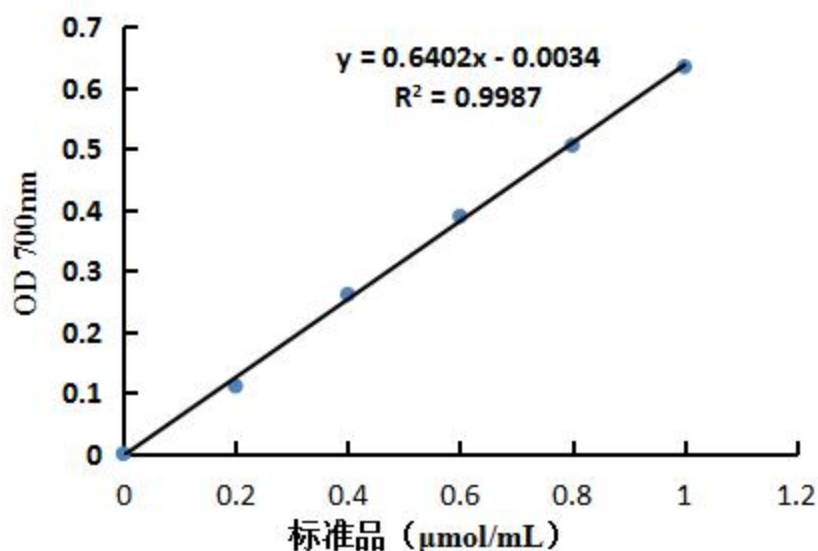
试剂二	100	100
37 °C 孵育 20 min		
试剂三	40	40
样本		100
混匀，12000rpm，4°C 离心 5min，上清液待测		

## 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， △A=A 测定 -A 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 ( $\mu\text{mol/mL}$ ),  $y$  是 $\Delta A$ 。



## 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  $1\mu\text{mol}$  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。

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

### 5、液体中 $\text{Ca}^{2+}$ -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。