

Ca²⁺-ATP 酶活性测定说明书

(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°C保存	
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4°C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°C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°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°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(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°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

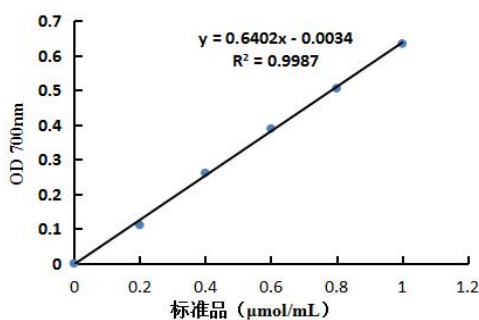
37°C 孵育 20min		
试剂三	40	40
样本		100
混匀, 12000rpm, 4°C离心 5min, 上清液待测		

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, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (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。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 15.93 \times (\Delta A + 0.0034) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 15.93 \times (\Delta A + 0.0034) \div W \end{aligned}$$

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。

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

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。

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

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 ($50\mu\text{mol/mL}$): 标准品用 1mL 提取液溶解。(母液需在两天内用)。
- 2 把母液用蒸馏水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。