

Ca²⁺-ATP 酶活性测定说明书

(货号: BP10484F 分光法 24 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

三、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	提取液 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 8mL 提取液, 混匀溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 15mL 提取液, 混匀溶解备用; 3. 需避光, 现配现用, 变蓝色不能使用。
试剂三	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	A:粉体 1 瓶 B:液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前在试剂 A 中加 4.57mL 的 B 液, 再加 35.43mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用; 2. 需避光, 现配现用, 变蓝色不能使用。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

【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、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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(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、检测步骤：

- ① 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：

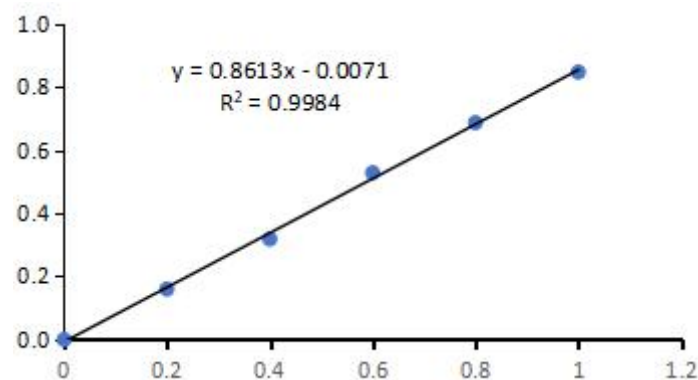
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
试剂一	200	
提取液		200
样本	200	
试剂二	200	200
37℃ 孵育 20min		
试剂三	80	80
样本		200
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测		

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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.8613x - 0.0071$ ，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。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0071) \div 0.8613 \times V_2] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 11.84 \times (\Delta A + 0.0071) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0071) \div 0.8613 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 11.84 \times (\Delta A + 0.0071) \div W \end{aligned}$$

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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0071) \div 0.8613 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \\ &= 0.024 \times (\Delta A + 0.0071) \end{aligned}$$

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。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mL})=[(\Delta A+0.0071)\div 0.8613\times V2]\div V1\div T=11.84\times(\Delta A+0.0071)$$

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, 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 标准品用 1mL 提取液溶解。（母液需在两天内用），标准品母液浓度为 50 $\mu\text{mol/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 20uL，加入 980uL 蒸馏水，混匀得到 1 $\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	150	
蒸馏水		150
试剂四	600	600
混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A=A_{\text{测定}}-0_{\text{浓度管}}$ 。		