

Mg²⁺-ATP 酶活性测定说明书

(货号:BP10485F 分光法 24 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

Mg²⁺-ATP 酶与细胞维持胞内 Mg²⁺浓度有关, 可在运输 Mg²⁺的同时催化 ATP 水解生成 ADP 和无机磷。通过测定无机磷的量可确定该酶活性高低。

二、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 18mL 蒸馏水, 混匀溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 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 9mL 蒸馏水, 混匀溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 9mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	A:粉体 1 瓶 B:液体 3mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前向 A 试剂中加 2.29mL 的 B 液, 再加 17.71mL 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。

三、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)。

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：

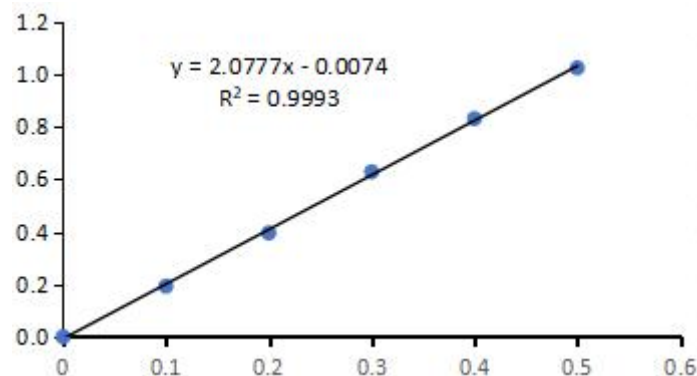
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
试剂一	300	300
试剂二	300	
蒸馏水		300
样本	300	300
37℃ 孵育 20min		
试剂三	150	150
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测		

④ 显色反应：

上清液	450	450
试剂四	300	300
混匀，室温静置 10min，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： $y = 2.0777x - 0.0074$ ， 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。

酶活力(μmol/h/mg prot)=[$(\Delta A + 0.0074) \div 2.0777 \times V_2$]÷($V_1 \times C_{pr}$)÷T=5.05×($\Delta A + 0.0074$)÷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)=[$(\Delta A + 0.0074) \div 2.0777 \times V_2$]÷($W \times V_1 \div V$)÷T=5.05×($\Delta A + 0.0074$)÷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/10⁴ cell)=[$(\Delta A + 0.0074) \div 2.0777 \times V_2$]÷($500 \times V_1 \div V$)÷T=0.0101×($\Delta A + 0.0074$)

5、液体中酶活力计算：

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)=[$(\Delta A + 0.0074) \div 2.0777 \times V_2$]÷ $V_1 \div T$ =5.05×($\Delta A + 0.0074$)

V---加入提取液体积, 1mL; V1---加入样本体积, 0.3mL ;
V2---酶促反应总体积, 1.05mL; 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 标准品用 1mL 蒸馏水溶解。（母液需在两天内用），标准品母液浓度为 50 μ 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, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μ 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：

1. 吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 5 μ mol/mL 的标品稀释液；						
2. 吸取 5 μ mol/mL 的标品稀释液 200uL，加入 1800uL 蒸馏水，混匀得到 0.5 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	120	240	360	480	600
水 uL	600	480	360	240	120	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 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	450	
蒸馏水		450
试剂四	300	300
混匀，室温静置 10min，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		