

Ca²⁺-ATP 酶活性测定说明书

(货号: BN72042 分光法 24 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:

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、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℃×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、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	

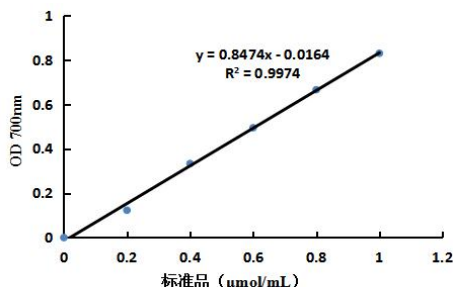
提取液		200
样本	200	
试剂二	200	200
37°C 孵育 20min		
试剂三	80	80
样本		200
混匀, 12000rpm, 4°C离心 5min, 上清液待测		

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: $y = 0.8474x - 0.0164$, 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。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V_2] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 12.04 \times (\Delta A + 0.0164) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 12.04 \times (\Delta A + 0.0164) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \\ &= 0.024 \times (\Delta A + 0.0164) \end{aligned}$$

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 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V_2] \div V_1 \div T = 12.04 \times (\Delta A + 0.0164)$$

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, 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 以上面不同浓度点为横坐标 (x), 对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y) 绘制标准曲线, 得到线性回归方程 $y = kx + b$, 将 ΔA 测定带入公式中计算 x ($\mu\text{mol/mL}$)。