

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1099

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：血清（浆）、动植物组织、细胞、细胞上清、细菌

产品简介

Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATP 酶（Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATPase）广泛分布于植物、动物、微生物和细胞中，是存在于组织细胞及细胞器的膜上的一种蛋白酶，可催化 ATP 水解生成 ADP 和无机磷，释放出能量。驱动细胞内的钙离子泵出细胞或者泵入内质网腔中储存起来，以维持细胞内低浓度的游离 Ca²⁺。本试剂盒提供了一种简单的检测方法检测生物样本中 Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATPase 的活性水平。其原理是样本中存在的 Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATPase 分解 ATP 生成 ADP 及无机磷，通过测定生成的无机磷的量可确定 Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATPase 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃
反应缓冲液	5mL	10mL	4℃
试剂一	1	1	-20℃避光保存
试剂二	1mL	2mL	4℃
试剂三	1	1	4℃避光保存
试剂四	1	1	4℃避光保存
试剂五	1	1	4℃避光保存
试剂六	25mL	25mL	4℃
试剂七	5mL	10mL	4℃

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 660nm 处的吸光度）及水浴锅
 96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
 制冰机、低温离心机
 去离子水
 匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

提取液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
 反应缓冲液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
 试剂一：临用前加 6mL 去离子水溶解；-20℃避光保存。
 试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
 试剂三：临用前加 3mL 去离子水溶解；4℃避光保存。

产品说明书

试剂四：临用前加 25mL 去离子水溶解；4℃避光保存。

试剂五：临用前加 25mL 去离子水溶解；4℃避光保存。

试剂六：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

0.5 μmol/mL 标准磷应用液配制：将试剂七 20 倍稀释，如取 0.1mL 试剂七加 1.9mL 去离子水充分混匀。

定磷剂的配制：按 H₂O：试剂四：试剂五：试剂六=2:1:1:1 的比例配制，配好的定磷剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂现配现用。

注意：试剂四、试剂五溶解后可在 4℃保存一周。配试剂最好用新的烧杯、玻璃棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿避免磷污染。

样本制备

血浆、血清等液体样本：可直接检测。

动植物组织样本：按 0.1g 组织加入 1mL 的提取液的比例进行冰浴匀浆。匀浆液于 4℃，8,000g 离心 10 min。取上清，置于冰上待测。

细胞或细菌样本：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）；然后 4℃，8,000g 离心 10min，取上清，置冰上待测。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。处理好的样本须当天检测。

如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 660nm，可见光分光光度计去离子水调零。

2. 酶促反应（在 EP 管中加入下列试剂）：

试剂	对照管 (μL)	测定管 (μL)
反应缓冲液	65	45
试剂一	60	60
试剂二	0	20
样本	0	100

混匀，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）水浴锅准确反应 10min

试剂三	25	25
样本	100	0

混匀，4,000g，常温离心 10min，取上清液

3. 定磷（96 孔板或微量玻璃比色皿中加入下列试剂）

试剂	空白孔 (μL)	标准孔 (μL)	对照孔 (μL)	测定孔 (μL)
0.5 μmol/mL 标准磷应用液	0	20	0	0
上清液	0	0	20	20
去离子水	20	0	0	0
定磷剂	200	200	200	200

4. 混匀，室温放置 30min，在 660nm 处，记录各管吸光值 A，分别记为 A_{空白}、A_{标准}、A_{对照}、A_{测定}。

注意：每个样本均需要做对照孔，空白孔和标准孔各做 1 个即可。实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 A_{测定}-A_{对照} 小于 0.001 可适当加大样本量；如果 A_{测定}-A_{对照} 大于 1.5 或测定孔有明显浑浊，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

产品说明书

结果计算

血清（浆）等液体样本 Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATPase 活力的计算：

活性单位的定义：每小时每毫升液体样本中 Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATPase 在反应体系中分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量定义为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATPase 活力 (U/mL)} = C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样}} \div T = 7.5 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})$$

2、组织、细菌或细胞中 Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATPase 活力的计算：

(1) 按蛋白浓度计算：

活性单位的定义：每小时每毫克组织蛋白中 Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATPase 在反应体系中分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量定义为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATPase 活力 (U/mg prot)} = C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反应}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 7.5 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

活性单位的定义：每小时每克组织中 Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATPase 在反应体系中分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量定义为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATPase 活力 (U/g)} = C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 7.5 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

活性单位的定义：每小时每 1 万个细菌或细胞中 Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATPase 在反应体系中分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量定义为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{-ATPase 活力 (U/10}^4\text{ cells)} = C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 0.015 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})$$

C_{标准}：标准管浓度，0.5 μmol/mL；V_{反应}：酶促反应总体积，0.25mL；V_样：加入样本体积，0.1mL；V_{样总}：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，1/6 小时；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；500：细菌或细胞总数，500 万个。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1098 Na⁺K⁺ ——ATP 酶检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

