

Mg²⁺-ATP 酶活性测定试剂盒

分光法 24 样

产品简介:

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。

试剂盒组成和配制:

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 18mL 蒸馏水，混匀溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	-20℃保存	用前甩几下蒸馏使试剂落入底部，再加 9mL 蒸馏水。混匀溶解备用。
试剂三	液体 9mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	A: 粉体 mg×1 瓶 B: 液体 1mL×1 瓶	4℃保存	临用前向 A 试剂中加 1.35mL 的 B 液，再加 17.4mL 的蒸馏水，混匀溶解备用。

[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。

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。

Mg²⁺ - 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/真菌样本:

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 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°C)。

③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (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°C 孵育 20min。		
试剂三	150	150
混匀，12000rpm，4°C离心 5min，上清液待测。		

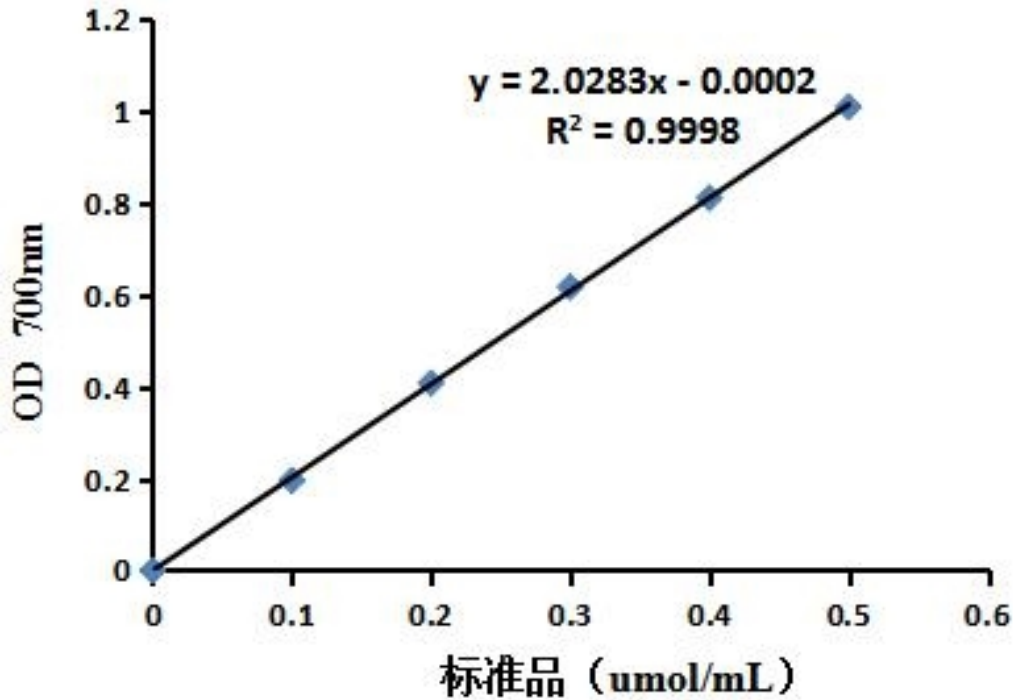
④ 显色反应：

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）。		

结果计算：

1、标准曲线方程：

$y = 2.0283x - 0.0002$, 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 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力 (μ mol/h/mg prot)=[(Δ A+0.0002) \div 2.0283 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T=5.18 \times (Δ A+0.0002) \div Cpr。

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织分解 ATP 产生 1 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力 (μ mol/h/g 鲜重)=[(Δ A+0.0002) \div 2.0283 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T=5.18 \times (Δ A+0.0002) \div 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 1 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力 (μ mol/h/ 10^4 cell)=[(Δ A+0.0002) \div 2.0283 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T=0.0104 \times (Δ A+0.0002)

5、液体中 Mg^{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。

酶活力($\mu\text{mol/h/mL}$)= $[(\Delta A+0.0002)\div 2.0283\times V2]\div V1\div T=5.18\times(\Delta A+0.0002)$

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. 制备标准品母液 ($5\mu\text{mol/mL}$)：标准品用 10mL 蒸馏水溶解。(母液需在两天内用)。
2. 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.42, 0.5. $\mu\text{mol/mL}$ 。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。