

Mg²⁺ - ATP 试剂盒

微板法 48 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。

所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

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 90mL×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 20mL 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 5mL×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 0.9mL 的 B 液，再加 11.6mL 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。

M g ² + - A T P 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/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°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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 700nm，所有试剂解冻至室温（25°C）。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ μ L）	测定管	对照管
试剂一	100	100
试剂二	100	
蒸馏水		100
样本	100	100

37°C 孵育 20min		
试剂三	50	50
混匀，12000rpm，4°C离心 5min，上清液待测		

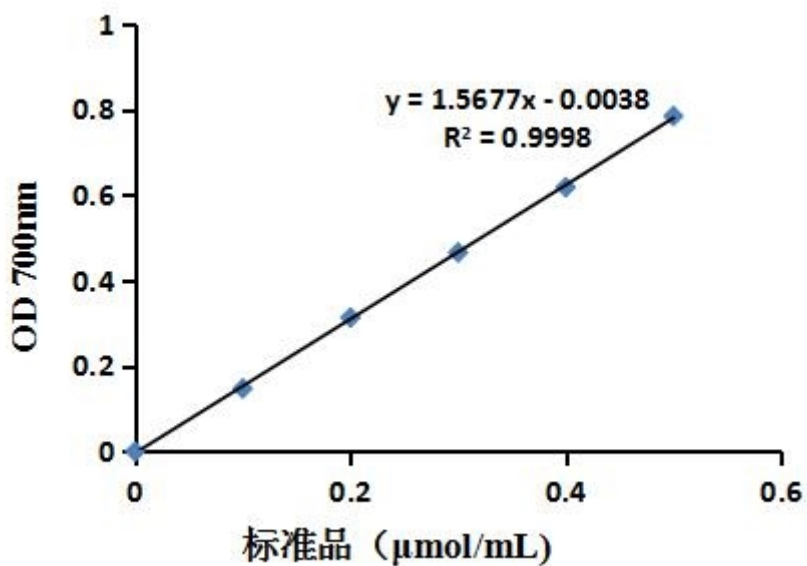
③ 显色反应 (在 96 孔板中操作):

上清液	150	150
试剂四	100	100
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:

$y = 1.5677x - 0.0038$, 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。

$$\begin{aligned}\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0038) \div 1.5677 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 6.7 \times (\Delta A + 0.0038) \div \text{Cpr}.\end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

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

$$\begin{aligned}\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0038) \div 1.5677 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 6.7 \times (\Delta A + 0.0038) \div W.\end{aligned}$$

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 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{酶活力}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0038) \div 1.5677 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \\ &= 0.0134 \times (\Delta A + 0.0038)\end{aligned}$$

5、液体中酶活力计算：

定义：每小时每毫升液体分解 ATP 产生 1 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0038) \div 1.5677 \times V_2] \div V_1 \div T = 6.7 \times (\Delta A + 0.0038)$$

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入样本体积，0.1mL；

V2---酶促反应总体积，0.35mL； 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 (1nmol/ μ L)：向标准品 EP 管里面加入 0.6mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ C保存)。

- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. nmol/ μ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照 20 μ L 标准品+170 μ L 试剂一+10 μ L 试剂三, 根据结果即可制作标准曲线。