

Mg²⁺-EGTA-ATP 酶测试盒说明书(精简版)

(货号: A070-7 测鱼肉样本)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 测试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

	组份	50 管/25 样	100 管/50 样	保存
试剂一	液体	4mL×1 瓶	8mL×1 瓶	4℃
试剂二	液体	2mL×1 瓶	3mL×1 瓶	4℃
试剂三	液体	2mL×1 瓶	3mL×1 瓶	4℃
试剂四	粉剂	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃
试剂四的配制: 用时每支试剂四粉剂加双蒸水 5mL, 充分溶解。(用不完 -20℃ 以下可保存一周。)				
试剂五	粉剂	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃
试剂五的配制: 用时每支试剂五加双蒸水 5mL, 适当加热溶解, 4℃ 保存 3 个月。				
试剂六	粉剂	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃
试剂六的配制: 用时每支试剂六加双蒸水 10mL, 室温保存 3 个月。				
[注]: 试剂六为过饱和溶液, 所以在配制时最好用 90℃~100℃ 的热双蒸水 10.3mL (热胀冷缩) 边隔水加热边用玻璃棒搅拌, 以使其充分溶解。一次实验用不完再用时可能有结晶, 用之前可以再次边隔水加热边玻璃棒搅拌使其溶解。				
试剂七	液体	3mL×1 瓶	3mL×1 瓶	4℃
试剂七的配制: 用时每瓶试剂七加双蒸水 4.5mL, 4℃ 保存 6 个月。				
试剂八	10mmol/L 标准磷贮液	5mL×1 瓶	5mL×1 瓶	4℃
试剂九 (定磷剂)	甲液	7mL×2 瓶	7mL×4 瓶	4℃
	乙液	6mL×2 瓶	6mL×4 瓶	4℃ 避光
[注]: 定磷剂乙液在冬天或 4℃ 长时间保存时可能会出现凝胶状物质, 37℃ 溶解不了, 可将其 60℃ 左右水浴 10 分钟即可完全溶解; 甲液、乙液应防止磷污染。				
试剂十	终止剂	30mL×1 瓶	60mL×1 瓶	室温
0.1μmol/mL 标准磷应用液的配制: 用时将 10mmol/L 磷贮液 100 倍稀释, 即取 0.1mL 加双蒸水至 10mL。				
0.02μmol/mL 磷标准液的配制: 用时将 0.1μmol/mL 磷标准液用双蒸水 5 倍稀释, 即取 0.1μmol/mL 磷标准液 1mL 加双蒸水 4mL。				
定磷剂的配制: 用时取一瓶试剂九甲液加入一瓶已预温好试剂九乙液中, 充分混匀, 需提前 0.5 小时配制, 2~8℃ 条件下至少可保存 5 天, 配好的显色剂的量够做 13 个管子 (如果你的样本量很少, 所需的显色剂的量较少, 那么你可以按试剂九中的甲液: 乙液=7:6 的比例自行配制显色剂, 需多少配多少 (按比例配制显色剂时要防止磷污染, 最好用专用吸嘴)。				

二、所需仪器耗材及试剂:

含 636nm 波长的分光光度计及 0.5cm 光径比色皿 (或酶标仪及 96 孔板)、37℃ 水浴锅或恒温箱、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水 (0.9%)、涡旋混匀器、试管或离心管、血红蛋白测定试剂 (本公司有售)。

三、测定原理:

肌球蛋白及肌动蛋白的 ATPase 很容易受到 Ca²⁺、Mg²⁺、EGTA、对氯汞基苯 (PCMB)、离子强度及 pH 值的影响。因此, 选择严格的条件来测定 ATPase 活性, 可以反映出蛋白质特定的性质。组成鱼类肌肉蛋白质的肌球蛋白和肌动蛋白在切断 ATP 末端的磷酸基后生成 ADP 和无机磷酸。利用这一点, 将生成的无机磷酸比色定量后可以表示 ATPase 活性。

四、样本的前处理:

鱼肉肌原纤维蛋白的提取: 准确称取鱼肉样本, 自然解冻, 剪碎。称取碎肉 1g, 加入 15mL 预冷的生理盐水作为匀浆介质进行匀浆, 然后用 9500rpm 冷冻离心 30min, 取上清液, 加入 3 倍预冷的双蒸水, 摇匀, 再次用 9500rpm 冷冻离心 30min, 弃上清液, 留沉淀。用预冷的生理盐水溶解, 用力摇

匀, 最后用 9500rpm 冷冻离心 20min, 取上清液, 即为肌原纤维蛋白液。

五、规范操作步骤:

1、酶促反应:

加入物	对照管	测定管
试剂一 (μL)	70	70
试剂二 (μL)	20	
试剂三 (μL)		20
试剂四 (μL)	20	20
试剂五 (μL)		20
试剂六 (μL)	20	
样本 (μL)		100
混匀, 37℃ 水浴准确反应 10 分钟		
试剂七 (μL)	50	50
样本 (μL)	100	
混匀, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清 150μl 定磷。		

2、定磷反应:

	空白管	标准管	对照管	测定管
双蒸水 (mL)	0.15			
0.02μmol/mL 磷标准液 (mL)		0.15		
上清液 (mL)			0.15	0.15
定磷剂应用液 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5
混匀, 室温静止 2 分钟				
终止剂 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5
混匀, 37℃ 静置 5-10 分钟, 在 636nm 处, 0.5cm 光径, 双蒸水调零, 测各管吸光度值。[注]: 在比色前, 将比色皿用自来水冲洗 10 余次, 再用双蒸水冲洗 4~5 次, 以免磷污染。				

六、计算公式:

① 定义: 规定每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔磷/毫克蛋白/小时 (μmolPi/mgprot/hour)。

② 计算公式:

$$\text{Mg}^{2+} - \text{EGTA} - \text{ATP 酶活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{T}{60} \times N \div \text{Cpr}$$

C_{标准}: 标准品浓度, 0.02μmol/mL;

T: 反应时间, 10min;

N: 反应体系稀释倍数, 2.8;

Cpr: 样本蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

七、测定意义:

ATP 酶活性可以分为 Ca²⁺-ATPase 活性、Mg²⁺-ATPase 活性、Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 活性和 Mg²⁺-EGTA-ATPase 活性。Ca²⁺-ATPase 活性是评价肌球蛋白完整性的良好指标, Mg²⁺-ATPase 活性是在有内源性 Ca²⁺ 情况下评价肌球蛋白复合体的完整性的指标, Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 活性是在无内源性 Ca²⁺ 情况下评价肌球蛋白复合体的完整性的指标, 而 Mg²⁺-EGTA-ATPase 活性则表明了原肌球蛋白-肌钙蛋白复合体的完整性。因此肌原纤维蛋白的 ATPase 活性常常作为评价肌球蛋白完整性的指标, 用于评价鱼肉或鱼糜蛋白的变性程度。