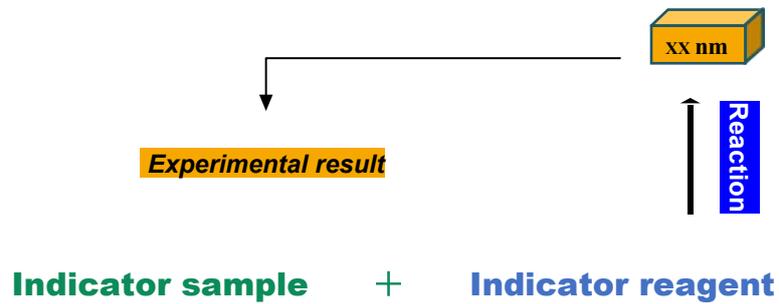


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

## 氢-钾ATP酶 (H<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase) 试剂盒说明书 (比色法)

### 一、测试原理：

ATP 酶可分解 ATP 生成 ADP 及无机磷，测定无机磷的量可判断 ATP 酶活力的高低。H<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP 酶是一种能被钾专一激活而不被乌本苷抑制的 ATP 酶。需自备的仪器和用品：

### 二、试剂组成与配制：

|   | 组份             | 100 管/48 样 | 保存     |
|---|----------------|------------|--------|
| 试剂一   | 液体             | 10ml × 2瓶  | 4℃保存   |
| 试剂二   | 液体             | 7ml × 1瓶   | 4℃保存   |
| 试剂三   | 液体             | 8ml × 1瓶   | 4℃保存   |
| 试剂四   | 粉剂             | 粉剂 × 2支    | -20℃保存 |
| 试剂四的配制：用时每支试剂四粉剂加双蒸水至5ml，现用现配，余下的-20℃以下可保存1周。 |                |            |        |
| 试剂五   | 粉剂             | 粉剂 × 2支    | 4℃保存   |
| 试剂五的配制：用时每支试剂五粉剂加双蒸水至5ml，适当加热溶解，4℃保存。         |                |            |        |
| 试剂六   | 液体             | 3ml × 1支   | 4℃保存   |
| 试剂七   | 液体             | 10ml × 1支  | 4℃保存   |
| 试剂七的配制：用时每支试剂七液体加双蒸水至25ml，室温保存。               |                |            |        |
| 试剂八   | 粉剂             | 粉剂 × 3瓶    | 4℃保存   |
| 试剂八的配制：用时每瓶试剂八加双蒸水至40ml溶解，溶解后4℃可保存一周。         |                |            |        |
| 试剂九   | 粉剂             | 粉剂 × 1瓶    | 4℃保存   |
| 试剂九的配制：用时每瓶试剂九粉剂加双蒸水至100ml溶解，室温保存。            |                |            |        |
| 试剂十   | 液体             | 100ml × 1瓶 | 室温保存   |
| 试剂十一  | 10mmol/L标准品贮备液 | 10ml × 1瓶  | 4℃保存   |

0.5 μmol/ml 标准液的配制：用时按10mmol/L标准贮备液：双蒸水 = 1 : 19的比例配制，即取0.5ml加双蒸水定容至10ml。

定凝剂的配制：按双蒸水：试剂十：试剂八：试剂九=2：1：1：1的比例配制。配好的定磷剂应为浅黄色，若无色则试剂无效，若蓝色则为磷污染，定磷剂需用现配。

### 三、样本前处理

准确称取组织重量，按重量 (g)：体积 (ml) = 1: 9 的比例，加入 9 倍体积的生理盐水，冰水浴条件下制备成 10%的组织匀浆液，2500 转/分，离心 10 分钟，取上清液待测。

#### 四、操作步骤:

##### 1、酶促反应:

|          | 对照管 | 测定管 |
|----------|-----|-----|
| 试剂一 (μl) | 130 | 130 |
| 试剂二 (μl) |     | 80  |
| 试剂三 (μl) | 120 |     |
| 试剂四 (μl) | 40  | 40  |
| 试剂五 (μl) | 40  | 40  |
| 试剂六 (μl) |     | 40  |
| 样 本 (μl) |     | 100 |

混匀 37°C水浴 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 400 μl 上清定磷

##### 2、定磷 :

| 管号                     | 标准管  | 对照管  | 测定管  |
|------------------------|------|------|------|
| 0.5 μmol/ml 标准应用液 (μl) | 400  |      |      |
| 对照管的上清液 (μl)           |      | 400  |      |
| 测定管的上清液 (μl)           |      |      | 400  |
| 定磷剂 (μl)               | 2000 | 2000 | 2000 |

混匀, 45°C水浴 5 分钟, 冷却至室温, 660nm 处, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测各管吸光度值。

#### 五、计算公式:

1、单位定义: 规定每小时每毫克组织蛋白的 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 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:

$$H^+K^+ - ATPase \text{ 活力}(U/ \text{mgprot}) = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(0.5 \mu\text{mol} / \text{ml})} \times \frac{\text{反应体系中样本}}{\text{稀释倍数}(4.8)} \times \frac{60 \text{分钟}}{10 \text{分钟}} \times \text{待测样本蛋白浓度} (\text{mgprot} / \text{ml})$$

(蛋白浓度可通过用总蛋白定量考马斯亮蓝法试剂盒测定)