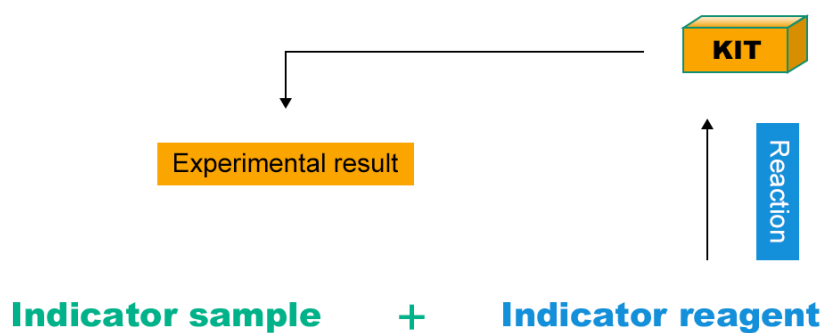


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0913

Size: 100T/48S

H⁺K⁺-ATP 酶检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义：

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⁺K⁺-ATP 酶是一种能被钾专一激活而不被乌本苷抑制的 ATP 酶。

二、试剂的组成和配置：

	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，定磷剂需现用现配。			

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：

● 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℃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

● 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℃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：

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

(蛋白浓度可通过用总蛋白定量考马斯亮蓝法试剂盒测定)