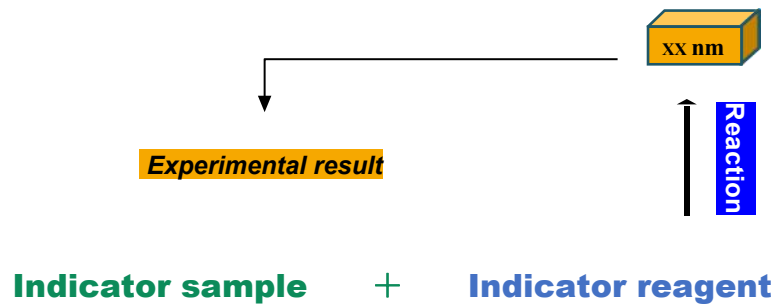


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

Na⁺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

Na⁺K⁺-ATP酶广泛分布于植物、动物、微生物和细胞中，可催化ATP水解生成ADP和无机磷。Na⁺K⁺-ATP酶分解ATP生成ADP及无机磷，通过测定无机磷的量来确定ATP酶活性。

自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体100mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃保存	临用前加入6ml蒸馏水充分混匀待用；用不完的4℃保存一周
试剂三	液体 2ml×1 瓶	4℃保存	-
试剂四	粉剂×1瓶	4℃保存	用时加入3mL蒸馏水4℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	4℃保存	用时加入25ml蒸馏水，溶解后4℃保存一周
试剂六	粉剂×1 瓶	4℃保存	用时加入25ml蒸馏水，溶解后4℃保存一周
试剂七	液体25ml×1瓶	室温保存	-
试剂八	10mmol/L 标准磷 贮备液 10mL×1 瓶	4℃保存	-

0.5 μmol/mL 标准磷应用液配制：将试剂八 20倍稀释，即取 0.1mL试剂八加1.9mL蒸馏水充分混匀。

定磷剂的配制：按H₂O:试剂五:试剂六:试剂七=2:1:1:1 的比例配制，配好的定磷剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂现用现配。

注意：配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

样品酶液的制备：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每500万细菌或细胞加入1mL提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率20%，超声3s，间隔10s，重复30次）；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

组织：称取约0.1g组织，加入1mL提取液进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）样品：直接检测。

操作步骤：

1、分光光度计预热30min以上，调节波长至660nm，蒸馏水调零。

2、酶促反应（在EP管中加入下列试剂）

	对照管	测定管
试剂一（ μL ）	65	45
试剂二（ μL ）	60	60
试剂三（ μL ）		20
样本（ μL ）		100

混匀，37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）准确水浴10min

试剂四（ μL ）	25	25
样本（ μL ）	100	

混匀，8000g，常温离心10min，取上清液

3、定磷（在EP管或96孔板中依次加入下列试剂）

	空白管	标准管	对照管	测定管
0.5 $\mu\text{mol/ml}$ 标准磷应用液（ μL ）		20		
上清液（ μL ）			20	20
蒸馏水（ μL ）	20			
定磷试剂（ μL ）	200	200	200	200

混匀，室温放置30min，在660nm处，记录各管吸光值。

注意：

1. 由于每一个样都必须做对照，本试剂盒100管保证测48份 Na^+K^+ -ATP酶。
2. 此法具有微量、灵敏、快速的特点。所以对测定所用试管要求严格无磷。
3. 空白管和标准管只要做一管。

计算：

1. 血清（浆） Na^+K^+ -ATPase活力的计算：

定义：规定每小时每毫升血清（浆）中 Na^+K^+ -ATP酶分解ATP产生 $1\ \mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

Na^+K^+ -ATP酶活力 (U/mL) = (C标准管 × V总) × (A测定管 - A对照管) ÷ (A标准管 - A空白管) ÷ V样 ÷ T = 7.5 × (A测定管 - A对照管) ÷ (A标准管 - A空白管)

2. 组织、细菌或细胞中 Na^+K^+ -ATPase活力的计算：

(1) 按蛋白浓度计算：

定义：规定每小时每毫克组织蛋白中 Na^+K^+ -ATP酶分解ATP产生 $1\ \mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

Na^+K^+ -ATP酶活力 (U/mg) = C标准管 × (A测定管 - A对照管) ÷ (A标准管 - A空白管) × V总 ÷ (Cpr × V样) ÷ T = 7.5 × (A测定管 - A对照管) ÷ (A标准管 - A空白管) ÷ Cpr

(2) 按样本鲜重计算：

定义：规定每小时每克组织中 Na^+K^+ -ATP酶分解ATP产生 $1\ \mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

Na^+K^+ -ATP酶活力 (U/g) = C标准管 × (A测定管 - A对照管) ÷ (A标准管 - A空白管) × V总 ÷ (V样 ÷ V样总 × W) ÷ T = 7.5 × (A测定管 - A对照管) ÷ (A标准管 - A空白管) ÷ W

(3) 按细菌或细胞密度计算：

定义：规定每小时每1万个细菌或细胞中 Na^+K^+ -ATP酶分解ATP产生 $1\ \mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

Na^+K^+ -ATP酶活力 (U/10⁴) = C标准管 × (A测定管 - A对照管) ÷ (A标准管 - A空白管) × V总 ÷ (V样 ÷ V样总 × 500) ÷ T = 0.015 × (A测定管 - A对照管) ÷ (A标准管 - A空白管)

C标准管：标准管浓度， $0.5\ \mu\text{mol/mL}$ ；V总：酶促反应总体积， 0.25mL ；V样：加入样本体积， 0.1mL ；V样总：加入提取液体积， 1mL ；T：反应时间， $1/6$ 小时；Cpr：样本蛋白质浓度， mg/mL ；W：样本鲜重，g；500：细菌或细胞总数，500万。