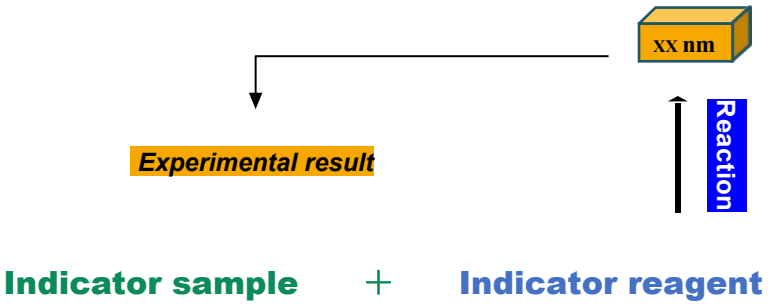
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0641　　规格：50管/24样

Na+k+ ——ATP酶检测试剂盒说明书

可见分光光度法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂三	液体 5ml×1 瓶	4℃保存	-
试剂四	粉剂×3支	-20℃保存	用时每支加1mL蒸馏水，现用现配。用不完的试剂-20℃。可保存一周。
试剂五	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂六	粉剂×1 瓶	4℃保存	用时加入 3mL 蒸馏水， 4℃保存
试剂七	粉剂×1 瓶	4℃保存	用时加入 25mL 蒸馏水，溶解后 4℃保存一周
试剂八	粉剂×1 瓶	4℃保存	用时加入 25mL 蒸馏水，溶解后 4℃保存一周
试剂九	液体 25mL×1 瓶	室温保存	-
试剂十	10mmol/L 标准磷贮备液 10mL×1 瓶	4℃保存	-
0.5μmol/mL标准磷应用液配制：将贮备液20倍稀释，即取0.1mL试剂十加1.9mL蒸馏水充分混匀。			

定磷剂的配制：按 H_2O：试剂七: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。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂现用现配。

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；按照细菌或细胞数量（10^4个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 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 20%或 200W，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：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 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）	130	90
试剂二（μL）	40	40
试剂三（μL）	40	40
试剂四（μL）	40	40
试剂五（μL）		40
样本 （μL）		200
混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确水浴 10min		
试剂六（μL）	50	50
样本 （μL）	200	

混匀，8000g，25℃离心 10min，取上清液

3 定磷(在 1.5mLEP 管中依次加入下列试剂)

	空白管	标准管	对照管	测定管
0.5μmol/ml 标准磷应用液（μL）		100		
上清液（μL）			100	100
蒸馏水（μL）	100			
定磷试剂（μL）	1000	1000	1000	1000

混匀，室温放置 30 min，在 660nm 处比色。

注意：

1、由于每一个样都必须做对照，本试剂盒50管保证测24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：每小时每毫升血清（浆）中 Na^+ K^+-ATP 酶分解ATP产生1μmol无机磷的量为一个酶活力单位。

Na^+ K^+-ATP酶活力（μmol/h/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：每小时每毫克组织蛋白中 Na^+ K^+-ATP酶分解ATP产生1μmol无机磷的量为一个酶活力单位。

Na^+ K^+-ATP酶活力（μmol/h /mg）= [C标准管×V总]×（A测定管-A对照管）÷（A标准管-A 空白管）÷（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：每小时每克组织中Na^+ K^+ -ATP 酶分解ATP产生1μmol无机磷的量为一个酶活力单位。

Na^+ K^+-ATP 酶活力（μmol/h/g）= [C标准管×V总]×（A测定管-A 对照管）÷（A标准管-A 空白管）÷（W× V 样÷V 样总）÷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：每小时每1万个细菌或细胞中 Na^+ K^+-ATP 酶分解ATP产生1μmol无机磷的量为一个酶活力单位。

Na^+ K^+-ATP 酶活力（μmol/h /10^4）= [C标准管×V总]×（A测定管-A对照管）÷（A标准管-A空白管）÷（500×V样÷V样总）÷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，0.5μmol/mL；V 总：酶促反应总体积，0.5mL；V 样：加入样本体积，0.2mL ；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。