



超微量 Na⁺K⁺-ATP 酶测试盒说明书(精简版)

(货号: A070-2 测全血、红细胞)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预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、测定意义:

ATP 酶存在与组织细胞及细胞器的膜上,是生物膜上的一种蛋白酶,它在物质运送、能量转换以及信息传递方面具有重要的作用,机体在缺氧及一些疾病状态下,此酶活力发生一系列改变,另外有些遗传疾病也与此酶活力有关。

二、测定原理:

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。

三、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

	组份	50 管/24 样 (A070-2-3)	100 管/48 样 (A070-2-4)	保存
试剂一	液体	13mL×1瓶	13mL×2瓶	4℃
试剂二	液体	4mL×1瓶	4mL×2瓶	4℃
试剂三	粉剂	粉剂×4支	粉剂×8支	-20℃
试剂三的配制: 用时每支试剂三粉剂加双蒸水 1mL, 充分溶解。(用不完-20℃以下可保存一周。)				
试剂四	液体	5mL×1瓶	5mL×2瓶	4℃
试剂五	甲液	7mL×4瓶	7mL×8瓶	4℃
	乙液	6mL×4瓶	6mL×8瓶	4℃避光
[注]: 试剂五乙液在冬天或 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。				
试剂六	液体	50mL×1瓶	50mL×2瓶	
试剂七	10mmol/L 标准磷贮备液	5mL×1瓶	5mL×1瓶	4℃
试剂十	贮备液	0.1mL×2支	0.1 mL×4支	4℃
	稀释液	0.9 mL×2支	0.9 mL×4支	4℃
双蒸水		40mL×1瓶	40mL×1瓶	4℃或室温
0.1μmol/mL 标准磷应用液的配制: 用时将 10mmol/L 磷贮备液 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。				
基质液的配制: 按试剂一: 试剂二: 试剂三=260: 80: 80 比例混合。需多少配多少, 现用现配。				
显色剂的配制: 用时取一瓶试剂五甲液加入一瓶已预温好试剂五乙液中, 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, 那么你可以按试剂五中的甲液: 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))。				

四、所需仪器耗材及试剂:

含 636nm 波长的分光光度计及 1cm 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)。

五、样本前处理:

1、红细胞的前处理:

①、**红细胞计数** (见附录) 或 **血红蛋白测定** (试剂本所有售)。

②、**红细胞溶血液的制备:**

a、**压积红细胞溶血液的制备:** 取肝素抗凝全血, 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上层血清, 留下层压积红细胞, 取一定量的压积红细胞, 加 49 倍的双蒸水, 例如取 5μL 的压积红细胞加入 245μL 双蒸水中, 混匀, 使其充分溶血, 对光观察直至溶液

透亮。如果预试结果太高, 再将溶血液稀释成不同浓度再进行预试后, 再决定取样浓度。

b、**全血红细胞溶血液的制备:** 取小鼠全血, 轻轻摇匀, 取一定量的全血按照 1: 24 的体积比加 24 倍双蒸水, 制成 25 倍稀释的溶血液, 例如取 5μL 的全血加双蒸水 120μL 充分混匀, 制成 25 倍稀释的溶血液。对光观察直至溶液透亮。如果预试结果太高, 再将溶血液稀释成不同浓度再进行预试后, 再决定取样浓度。

[注 1]: 制备好的溶血液尽快进行检测, 否则易失活, 因而必须在所有的准备工作做好以后再配制溶血液。

[注 2]: 用不完的抗凝全血 4℃可保存 2~3 天, -20℃以下保存一周或者更长时间。

[注 3]: 不可用磷酸盐缓冲液或含磷的试剂稀释样本。

[注 4]: 预试结果将绝对吸光度值 (测定管吸光度值-对照管吸光度值) 控制在 0.2 左右为宜。

六、规范操作步骤:

1、酶促反应:

	对照管	测定管
双蒸水 (mL)	0.16	0.1
样本 (mL)		0.1
试剂十 (mL)		0.06
试剂一 (mL)	0.26	0.26
试剂二 (mL)	0.08	0.08
试剂三 (mL)	0.08	0.08
混匀, 37℃准确反应 10 分钟		
试剂四 (mL)	0.1	0.1
样本 (mL)	0.1	
混匀, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清作定磷反应		

2、定磷反应:

	空白管	标准管	对照管	测定管
双蒸水 (mL)	0.3			
0.02μmol/mL 磷标准液 (mL)		0.3		
上清液 (mL)			0.3	0.3
试剂五显色剂 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀, 室温静止 2 分钟				
试剂六 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀, 37℃静置 5-10 分钟, 在 636nm 处, 1cm 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。

七、如果你的样本数量很多可以采用简便操作法:

1、基质液的配制 (“试剂组成与配置”):

	对照管	测定管
双蒸水 (mL)	0.16	0.1
样本 (mL)		0.1
试剂十 (mL)		0.06
基质液 (mL)	0.42	0.42
混匀, 37℃准确反应 10 分钟		
试剂四 (mL)	0.1	0.1
样本 (mL)	0.1	
混匀, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清作定磷反应		

2、定磷反应:

	空白管	标准管	对照管	测定管
双蒸水 (mL)	0.3			
0.02μmol/mL 磷标准液 (mL)		0.3		
上清液 (mL)			0.3	0.3



试剂五显色剂 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀, 室温静置 2 分钟				
试剂六 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀, 37℃ 静置 5-10 分钟, 在 636nm 处, 1cm 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。

八、计算:

(一)、全血中 ATPase 的计算:

1、按红细胞数计算:

①、定义: 规定每小时每 10^7 个红细胞中 ATP 酶分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔磷/ 10^7 红细胞/小时 ($\mu\text{molPi}/10^7$ 个 RBC/hour) (U/ 10^7 个 RBC)。

②、计算公式:

$$\text{全血Na}^+\text{K}^+ - \text{ATP酶活力} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 6 \times N \times 7.8 \div C_{\text{RBC}} \quad (\text{U}/10^7 \text{个RBC})$$

[注]: 上式中的 6: 定义为每小时, 实际操作为 10 分钟反应, 所以必须乘以 6。上式中的 7.8: 反应体系中 7.8 倍稀释。 $C_{\text{标准}}$: 磷标准液浓度, $0.02\mu\text{mol}/\text{mL}$; N: 样本测试前稀释倍数; C_{RBC} : 全血中红细胞密度, 10^7 个/mL (RBC 指红细胞)。

2、按全血体积计算:

①、定义: 规定每小时每毫升全血中 ATP 酶分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔磷/毫升/小时 ($\mu\text{molPi}/\text{mL}/\text{hour}$) (U/mL)。

②、计算公式:

$$\text{全血Na}^+\text{K}^+ - \text{ATP酶活力} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 6 \times N \times 7.8 \quad (\text{U}/\text{mL})$$

$C_{\text{标准}}$: 磷标准液浓度, $0.02\mu\text{mol}/\text{mL}$; N: 样本测试前稀释倍数。

3、按血红蛋白量计算:

①、定义: 规定每小时每克血红蛋白相当的红细胞中 ATP 酶分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔磷/克血红蛋白/小时 ($\mu\text{molPi}/\text{gHb}/\text{hour}$) (U/gHb)。

②、计算公式:

$$\text{全血Na}^+\text{K}^+ - \text{ATP酶活力} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 6 \times N \times 7.8 \div C_{\text{Hb}} \quad (\text{U}/\text{gHb})$$

$C_{\text{标准}}$: 磷标准液浓度, $0.02\mu\text{mol}/\text{mL}$; N: 样本测试前稀释倍数; C_{Hb} : 血红蛋白含量, gHb/mL。

附录 I: 红细胞计数法

红细胞计数有以下三种方法, 只需取其中一种即可以。

1、计数板直接红细胞计数:

- ①、红细胞稀释液的配制: 柠檬酸三钠 3.8 克, 甲醛 1mL, 双蒸水 100mL, 混匀, 4℃ 保存。
- ②、取 1 支试管, 加入红细胞稀释液 2mL, 取抗凝全血 10μL 加入试管稀释液中, 反复吹吸数次, 再将试管颠倒数次混匀。
- ③、取一滴稀释血液灌入计数板。(应一次灌满, 而且不要灌得太多。)
- ④、用高倍镜计数左上、左下、右上、右下, 中央 5 个中方格的红细胞数, 将数得的数字 $\times 10^{10}$, 即为每升血中的红细胞数。

2、光电比浊法计红细胞数:

取试管 1 支, 加入上述红细胞稀释液 4mL, 再取 20μL 抗凝全血, 加入 4mL 稀释液中, 反复吹吸数次, 再将试管颠倒数次混匀, 立即倒入比色杯中, 于 540nm, 1cm 光径, 双蒸水调零进行比色, 记下吸光度值。以计数板计数的红细胞的数值为横坐标,

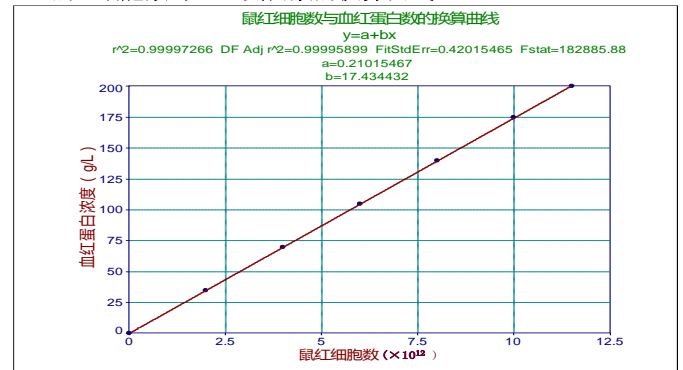
以相应管的吸光度值为纵坐标, 作标准曲线。您可以不做曲线, 用附录 II 参考标准曲线图二 (鼠红细胞数与比浊法吸光度换算曲线)。根据标准曲线查出红细胞数。

3、用血红蛋白 (Hb) 来换算红细胞数:

取 10μL 抗凝全血加入 2.5mL 血红蛋白测试液 (本所有供应) 中, 混匀, 静置 10 分钟, 于 540nm, 1cm 光径, 双蒸水调零进行比色。将测得的吸光度乘以 367.7 即为血红蛋白的值。以计数板计数的红细胞的数值为横坐标, 以相应管的血红蛋白数为纵坐标, 作标准曲线。您可以不做曲线, 用附录 II 的参考标准曲线图一 (鼠红细胞数与血红蛋白数的换算曲线)。根据标准曲线查出红细胞数。

附录 II: 鼠红细胞 ATPase 测定换算曲线

1、鼠红细胞数与血红蛋白数的换算曲线



2、鼠红细胞数与比浊法吸光度换算曲线

