

# H<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP 酶活力测试盒说明书(精简版)

(货号: A069-1)

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、试剂组成与配制:

组分	100 管/48 样 (货号 A069-1-1)	200 管/96 样 (货号 A069-1-2)	保存
试剂一	液体 10mL×2瓶	10mL×3瓶	4℃保存
试剂二	液体 7mL×1瓶	7mL×2瓶	4℃保存
试剂三	液体 8mL×1瓶	8mL×2瓶	4℃保存
试剂四	粉剂 粉剂×2支	粉剂×4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	粉剂×4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	3mL×2支	4℃保存
试剂七	液体 10mL×1支	10mL×2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	粉剂×5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	粉剂×2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	2.5mol/L硫酸 100mL×1瓶	100mL×2瓶	室温保存
试剂十一	10mmol/L 磷标准贮备液 10mL×1瓶	10mL×1瓶	4℃保存
0.5μmol/mL磷标准的配制: 用时按10mmol/L磷标准贮备液: 双蒸水=1:19的比例配制, 如取0.5mL加双蒸水9.5mL。			
定磷剂的配制: 按双蒸水:2.5mol/L硫酸: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。			

## 二、所需仪器耗材及试剂:

含 660nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪及 96 孔板)、37-45℃ 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、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用, 本公司有售)。

## 三、样本前处理

准确称取胃粘膜组织重量, 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, 再用生理盐水 5 倍稀释成 2% 的浓度待测。

## 四、规范操作步骤:

### 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℃ 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 400μL 上清作定磷反应。		

### 2、定磷反应:

管号	标准管	对照管	测定管
0.5μmol/mL 标准磷应用液 (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、如果您的样品很多可以采用简便操作法:

### 1、测试前将对照管试剂及测定管试剂分别配成混合试剂 A 液和 B 液, 具体配法如下:

根据规范操作表中各管的试剂量乘以您所需要测试的样本数 (n) 再放 1~2 只管的数量 (避免吸到最后试剂量不够) 然后纵向混合成 A 液 (对照管的加液) 及 B 液 (测定管的加液), 具体配制见下表:

管 号	对照管	测定管
试剂一 (μL)	130×(n+2)	130×(n+2)
试剂二 (μL)		80×(n+2)
试剂三 (μL)	120×(n+2)	
试剂四 (μL)	40×(n+2)	40×(n+2)
试剂五 (μL)	40×(n+2)	40×(n+2)
试剂六 (μL)		40×(n+2)
混合试剂总量 (μL)	330×(n+2)	330×(n+2)
每管应吸液量 (μL)	330	330

### 2、简化操作步骤:

#### ①、酶促反应:

管 号	对照管	测定管
对照管液 (A 液) (μL)	330	
测定管液 (B 液) (μL)		330
样 本 (μL)		100

混匀, 37℃ 水浴准确反应 10 分钟

试剂七 (μL)	50	50
样 本 (μL)	100	
混匀, 离心 3500 转/分×10 分钟, 取上清 400μL 上清作定磷反应。		

#### ②、定磷反应:

管 号	标准管	对照管	测定管
0.5μmol/mL 标准磷应用液 (μL)	400		
对照管上清液 (μL)		400	
测定管上清液 (μL)			400
定磷剂 (μL)	2000	2000	2000
混匀, 45℃ 水浴 5 分钟, 冷却至室温, 在 660nm, 1cm 光径, 双蒸水调零测各管吸光度值。			

## 六、计算:

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

$$\text{活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div \frac{T}{60} \div \text{Cpr}$$

C<sub>标准</sub>: 标准品浓度, 0.5μmol/mL;

N: 反应体系中样本的稀释倍数, 4.8;

T: 反应时间, 10min;

Cpr: 样本蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

## 七、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。

#### 八、注意事项：

- 1、具有微量、灵敏、快速的特点。所以对测定所用试管要求严格，要没有一点磷，若试管放过磷酸或磷酸缓冲液，一定要洗得非常干净，即先用洗洁精加水煮，再用自来水冲，最后用双蒸水冲干净。最好用一次性塑料管或新玻璃管，避免磷污染是检测成败的关键。
- 2、定磷剂配好后，不可放置太久，一般保存 1~5 天，最好现用现配。随时放冰箱。
- 3、最好采用先配 A、B 两种混合液，然后按简化操作步骤检测。这样快捷、准确。
- 4、所有配试剂的器皿均要专用，包括吸硫酸的吸管及盛水的器皿。

#### 九、测定意义：

$H^+K^+$ -ATPase 对胃酸的分泌及胃的消化功能具有重要的生理意义，70 年代 Forte 等人首先在牛蛙的胃粘膜上分离出一类能被  $K^+$  专一激活而不被乌本苷抑制的 ATPase 即  $H^+K^+$ -ATPase，随后 Lee j 等人又证明了含有该酶的膜囊泡运动跨膜运输质子的作用，从而为胃酸分泌的机理奠定了分子学基础， $H^+K^+$ -ATPase 定位于胃粘膜壁细胞 (Parietal cell) 上，属于第二类质子泵，它通过自身的磷酸化 ( $E_1 \rightarrow E_2$ ) 与去磷酸化 ( $E_2 \rightarrow E_1$ ) 完成的  $H^+/K^+$  电中性 (electroneutral) 跨膜离子转运，不断将壁细胞内的质子运输到膜外行使泌酸的功能。