



# 超微量 Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP 酶测试盒说明书

(货号: A070-2)

测组织、培养细胞)

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。

## 二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

	组份	50 管/24 样 (货号 A070-2-1)	100 管/48 样 (货号 A070-2-2)	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℃
试剂三应用液的配制: 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, 避免反复冻融)				
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	室温
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	0.1mL×4 支	4℃
	稀释液	0.9mL×2 支	0.9mL×4 支	4℃
试剂十应用液的配制: 取一支试剂十稀释液加到一支试剂十贮备液中, 用不完的 4℃保存。				
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, 如取 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, 如取 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: 试剂三应用液=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 (如果你的样本数量很少, 那么你可以按试剂五的甲液: 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))。				

## 三、所需仪器及试剂:

可见分光光度计及 1cm 光径比色皿, 涡旋混匀器。37℃ 水浴锅或恒温箱, 离心机, 双蒸水 (或去离子水), 蛋白测定试剂 (本公司有售)。

## 四、样本的前处理:

### 1、组织的前处理: (组织匀浆上清液的制备参考实验方法学)

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, 冰水浴条件下机械匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液 (即 10% 的匀浆上清液), 再用生理盐水 10 倍稀释成 1%, 同时用考马斯亮蓝试剂测定组织蛋白 (试剂本公司有售)。如果预试结果太高, 再将 1% 的组织匀浆稀释成不同浓度再进行预试后确定取样浓度。

2、培养细胞的前处理: 将培养细胞消化, 离心, 弃上清, 留下层细胞, 每管加 0.2~0.3mL 生理盐水或匀浆介质制备成 10<sup>7</sup>/cm<sup>3</sup> 细胞悬液, 即 10<sup>7</sup>/mL, 再进行破碎。破碎细胞的方法有三种: ①、用匀浆器匀浆。②、用超声粉碎机粉碎。③、反复冻溶 3 次 (第③种方法有时会影响酶活力)。制备好的细胞悬液不需要离心, 同时用考马斯亮蓝试剂测定组织蛋白

(试剂本公司有售)。再将细胞匀浆液稀释成不同浓度进行预试, 根据预试结果决定取样浓度。

[注 1]: 在测试加样前要摇匀后取样。

[注 2]: 不可用磷酸盐缓冲液或含磷的试剂作为样本匀浆或稀释样本。

[注 3]: 预试结果以绝对吸光度值 (A 测定-A 对照) 在 0.2 左右为宜。

## 五、规范操作步骤:

### 1、酶促反应:

	对照管	测定管
双蒸水 (mL)	0.16	0.12
样本 (mL)		0.1
试剂十应用液 (mL)		0.04
试剂一 (mL)	0.26	0.26
试剂二 (mL)	0.08	0.08
试剂三应用液 (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, 取上清定磷		

### 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
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 A (或是每管吸出 200μL 反应液, 加到 96 孔板中, 酶标仪 636nm 处读数)				

[注]: 在分光光度计比色前, 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。

## 六、如果你的样本数量很多可以采用简便操作法:

### 1、酶促反应(基质液配制见第一项)。

	对照管	测定管
双蒸水 (mL)	0.16	0.12
样本 (mL)		0.1
试剂十应用液 (mL)		0.04
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, 3000~4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清定磷		

### 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
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 A (或是每管吸出 200μL 反应液, 加到 96 孔板中, 酶标仪 636nm 处读数)				



## 七、计算公式：

1、定义：规定每小时每毫克组织蛋白的组织中 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/毫克蛋白/小时（ $\mu\text{molPi/mgprot/hour}$ ）。

### 2、计算公式：

$$\text{Na}^+\text{K}^+ - \text{ATP酶活力} \left( \text{U/mg 蛋白} \right) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{60}{T} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times N \div \text{Cpr}$$

$C_{\text{标准}}$  为磷标准液浓度, 0.02  $\mu\text{mol/mL}$  ;

$T$  为酶促反应时间, 10 分钟;

$V_{\text{反总}}$  为酶促反应体系总体积, 0.78 mL;

$V_{\text{样}}$  为取样量, 0.1 mL;

$N$ : 样本测试前稀释倍数（不包含样本前处理过程）;

$\text{Cpr}$  为匀浆液蛋白浓度, mg/mL。

## 八、测定意义：

ATP 酶存在于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。