

Na⁺K⁺-ATP 酶活性检测试剂盒说明书

Na⁺K⁺-ATPase Assay Kit

微量法

货号: AK271

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES37	100mL×1 瓶	4℃ 保存;
AK271-A	10mL×1 瓶	4℃ 保存;
AK271-B	粉剂×1 瓶	-20℃ 保存; 临用前加入6mL 蒸馏水充分混匀待用; 用不完的试剂4℃ 保存一周;
AK271-C	2mL×1 瓶	4℃ 保存。
AK271-D	粉剂×1 瓶	4℃ 保存。用时加入 3mL 蒸馏水, 4℃ 保存。
AK271-E	粉剂×1 瓶	4℃ 保存。用时加入 5mL 蒸馏水, 溶解后 4℃ 保存一周。
AK271-F	粉剂×1 瓶	4℃ 保存。用时加入 5mL 蒸馏水, 溶解后 4℃ 保存一周。
AK271-G	5mL×1 瓶	室温保存。
AK271-(标储)	1mL×1 瓶	10mmol/L 标准磷贮备液, 4℃ 保存。
标准磷应用液 (0.5μmol/mL) 配制: 将 AK271-(标储)用蒸馏水 20 倍稀释充分混匀即可。		
定磷剂的配制: 按 H ₂ O: AK271-E: F: G = 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。		

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

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。

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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 组织样本的制备:

按照组织质量(g): 提取液 ES37 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 ES37), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2. 细菌或细胞样本的制备:

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(10⁴ 个): 提取液 ES37 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 ES37), 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。

3. 血清(浆)样品: 直接检测。

测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 660nm, 蒸馏水调零。

2. 酶促反应: 在 EP 管中加入下列试剂

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)
AK271-A	65	45
AK271-B	60	60
AK271-C		20
样本		100
混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 准确水浴 10min		
AK271-D	25	25
样本	100	
混匀, 8000g, 25℃ 离心 10min, 取上清液		

3. 定磷 (在EP 管或96 孔板中加入下列试剂)

上清液	空白管 (μL)	标准管 (μL)	对照管 (μL)	测定管(μL)
标准磷应用液 (0.5μmol/mL)		20		
上清液 (μL)			20	20
蒸馏水	20			
定磷试剂	200	200	200	200
混匀, 室温放置30min, 在 660nm 处, 记录各管吸光值 A: A 空白管、A 标准管、A 对照管、A 测定管。				

4. 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) 空白管和标准管各只要做 1-2 管。

Na⁺K⁺-ATP 酶活性计算:

1. 血清 (浆) Na⁺K⁺-ATP 酶活力的计算:

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 (U/mL)

$$= [C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}] \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div V \text{ 样} \div T$$

$$= 7.5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

2. 组织、细菌或细胞中 Na⁺K⁺-ATP 酶活力的计算:

(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 (U/mg prot)

$$= [C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}] \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 7.5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

(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 (U/g 鲜重)

$$= [C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}] \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 7.5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

(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 (U/10⁴ cell)

$$= [C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}] \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 0.015 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

注： C 标准管：标准管浓度，0.5μmol/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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)