

Na⁺K⁺-ATP 酶活性检测试剂盒说明书

Na⁺K⁺-ATPase Assay Kit

可见分光光度法

货号：AK270

规格：50T/24S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
提取液 ES37	30mL×1 瓶	4℃保存；
AK270-A	10mL×1 瓶	4℃保存；
AK270-B	5mL×1 瓶	4℃保存；
AK270-C	5mL×1 瓶	4℃保存；
AK270-D	粉剂×3 瓶	-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。
AK270-E	5mL×1 瓶	4℃保存；
AK270-F	粉剂×1 瓶	4℃保存；用时加入 3mL 蒸馏水，4℃保存。
AK270-G	粉剂×1 瓶	4℃保存；用时加入 25mL 蒸馏水，溶解后 4℃保存一周。
AK270-H	粉剂×1 瓶	4℃保存；用时加入 25mL 蒸馏水，溶解后 4℃保存一周。
AK270-I	25mL×1 瓶	室温保存。
AK270-标储	1mL×1 瓶	10μmol/mL 标准磷贮备液，4℃保存。
标准磷应用液（0.5μmol/mL）配制： 将 AK270-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：AK270-G：H：I = 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、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。

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)
AK270-A	130	90
AK270-B	40	40
AK270-C	40	40
AK270-D	40	40
AK270-E		40
样本		200
混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 准确水浴 10min		
AK270-F	50	50
样本	200	
混匀, 8000g, 25℃ 离心 10min, 取上清液		

3. 定磷 (在 1.5ml EP 管中加入下列试剂)

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)		100		
上清液 (μL)			100	100
蒸馏水	100			
定磷试剂	1000	1000	1000	1000
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 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各做 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。

$$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力 (U/mL)} = [\text{C 标准管} \times \text{V 总}] \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{V 样} \div \text{T} \\ = 7.5 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$$

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。

$$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力 (U/mg prot)} = [\text{C 标准管} \times \text{V 总}] \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \\ \div (\text{Cpr} \times \text{V 样}) \div \text{T} = 7.5 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr}$$

- (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。

$$\text{Na+K+-ATP 酶活力 (U/g)} = [\text{C 标准管} \times \text{V 总}] \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div (\text{V 样} \div \text{V 样总} \times \text{W}) \div \text{T} = 7.5 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{W}$$

(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 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{Na+K+-ATP 酶活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\text{C 标准管} \times \text{V 总}] \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div (500 \times \text{V 样} \div \text{V 样总}) \div \text{T} = 0.015 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$$

注: C 标准管: 标准管浓度, 0.5 $\mu\text{mol/mL}$; 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。

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