

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	60mL×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、玻璃棒和玻璃移液器，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°C (哺乳动物) 或 25°C (其他物种) 准确水浴 10min		
AK271-D	25	25
样本	100	
混匀, 8000g, 25°C 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 (0.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)		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 酶活力计算:

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 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

Na^+K^+ -ATP 酶活力 (U/mL)

$$\begin{aligned} &= [\text{C 标准管} \times V_{\text{总}}] \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 7.5 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \end{aligned}$$

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 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

Na^+K^+ -ATP 酶活力 ($\text{U}/\text{mg prot}$)

$$\begin{aligned} &= [\text{C 标准管} \times V_{\text{总}}] \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 7.5 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div Cpr \end{aligned}$$

(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 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

Na^+K^+ -ATP 酶活力 ($\text{U}/\text{g 鲜重}$)

$$= [C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}] \times (A \text{ 测定管-A 对照管}) \div (A \text{ 标准管-A 空白管}) \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$
$$= 7.5 \times (A \text{ 测定管-A 对照管}) \div (A \text{ 标准管-A 空白管}) \div W$$

(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 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATP 酶分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATP 酶活力 ($\text{U}/10^4 \text{ cell}$)

$$= [C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}] \times (A \text{ 测定管-A 对照管}) \div (A \text{ 标准管-A 空白管}) \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$
$$= 0.015 \times (A \text{ 测定管-A 对照管}) \div (A \text{ 标准管-A 空白管})$$

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