

## Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP 酶活性测定说明书

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义：

Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-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。

### 测定原理：

Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-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。

### 试剂的组成和配制：

产品名称	OP003-50T/24S	Storage
提取液：液体	50ml	4°C
试剂一：液体	10ml	4°C
试剂二：液体	5ml	4°C
试剂三：液体	5ml	4°C
试剂四：粉剂	1 支×3	-20°C
试剂五：液体	5ml	4°C
试剂六：粉剂	1 瓶	4°C
试剂七：粉剂	1 瓶	4°C
试剂八：粉剂	1 瓶	4°C
试剂九：液体	25ml	室温
试剂十：10mmol/L 标准磷贮备液	10ml	4°C
说明书	一份	

试剂四：粉剂×3 支，-20°C保存。用时每支加 1ml 蒸馏水；用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融；

试剂七：粉剂×1 瓶，4°C保存。用时加入 25ml 蒸馏水，溶解后 4°C保存一周；

试剂八：粉剂×1 瓶，4°C保存。用时加入 25ml 蒸馏水，溶解后 4°C保存一周；

0.5μmol/ml 标准磷应用液配制：将贮备液 20 倍稀释，即取 0.1ml 试剂十加 1.9ml 蒸馏水充分混匀。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线：0518-81263339

官网：<http://www.bio149.com>

**定磷剂的配制：**按 H<sub>2</sub>O: 试剂七: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。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂现用现配。

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

**样品酶液的制备：**

**1、细菌、细胞或组织样品的制备：**

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（10<sup>4</sup>个）：提取液体积（ml）为 500~1000: 1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1ml 提取液），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。

组织：按照组织质量（g）：提取液体积(ml)为 1: 5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1ml 提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

**2、血清（浆）样品：直接检测。**

**操作步骤：**

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 660nm，蒸馏水调零。
- 2、酶促反应（在 EP 管中加入下列试剂）：

	对照管	测定管
试剂一（μl）	130	90
试剂二（μl）	40	40
试剂三（μl）	40	40
试剂四（μl）	40	40
试剂五（μl）		40
样本（μl）		200

混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确水浴 10min；

试剂六（μl）	50	50
样本（μl）	200	

混匀，8000g，25℃离心 10min，取上清液；

- 3、定磷(在 1.5mlEP 管中依次加入下列试剂)

	空白管	标准管	对照管	测定管
0.5μmol/ml 标准磷应用液（μl）		100		
上清液（μl）			100	100
蒸馏水（μl）	100			
定磷试剂（μl）	1000	1000	1000	1000

混匀，室温放置 30 min，在 660nm 处比色。



**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<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-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做一管。

**计算:**

**1、血清（浆）Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>- ATPase 活力的计算:**

定义：每小时每毫升血清（浆）中 Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>- ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

**2、组织、细菌或细胞中 Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>- ATPase 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<sup>+</sup>K<sup>+</sup>- ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算:

定义：每小时每克组织中 Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

(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<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

C 标准管：标准管浓度，0.5μmol/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。

