

Na⁺K⁺-ATP 酶活性测定说明书

微量法 100 管/48 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⁺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。

测定原理:

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。

试剂的组成和配制:

产品名称	OP004-100T/48S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 液体	10ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	-20°C
试剂三: 液体	2ml	4°C
试剂四: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂五: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂六: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂七: 液体	25ml	室温
试剂八: 10mmol/L 标准磷贮备液	10ml	4°C
说明书	一份	

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 6ml 蒸馏水充分混匀待用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存。用时加入 3ml 蒸馏水, 4°C 保存。

试剂五: 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;

试剂六: 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: 将试剂八 20 倍稀释, 即取 0.1ml 试剂八加 1.9ml 蒸馏水充分混匀;

定磷剂的配制: 按 H₂O: 试剂五:试剂六:试剂七=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。

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>

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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、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（ 10^4 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、分光光度计或酶标仪预热 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（ μ l）	65	45
试剂二（ μ l）	60	60
试剂三（ μ l）		20
样本（ μ l）		100

混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确水浴 10min

试剂四（ μ l）	25	25
样本（ μ l）	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）

	空白管	标准管	对照管	测定管
0.5 μ mol/ml 标准磷应用液（ μ l）		20		
上清液（ μ l）			20	20
蒸馏水（ μ l）	20			
定磷试剂（ μ l）	200	200	200	200

混匀，室温放置 30min，在 660nm 处，记录各管吸光值。

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、空白管和标准管只要做一管。

计算:

1、血清（浆）Na⁺K⁺-ATPase 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。

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

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

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

(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。

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

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

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

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。

