

超微量 Na⁺K⁺-ATP 酶测试盒

(货号: BC025 测组织、培养细胞)

一、测定原理:

ATP 酶可分解 ATP 生成 ADP 及无机磷,测定无机磷的量可判断 ATP 酶活力的高低。

二、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

	组份	50 管/24 样	100 管/48 样	保存
试剂一	液体	13mL×1瓶	13mL×2瓶	4℃
试剂二	液体	4mL×1瓶	4mL×2瓶	4℃
试剂三	粉剂	粉剂×4支	粉剂×8支	-20℃
试剂三的配制: 用时每支试剂三粉剂加双蒸水 1mL, 充分溶解。(用不完-20℃以下可保存一周。)				
试剂四	液体	5mL×1瓶	5mL×2瓶	4℃
试剂五	甲液	7mL×4瓶	7mL×8瓶	4℃
	乙液	6mL×4瓶	6mL×8瓶	4℃避光
[注]: 试剂五乙液在冬天或 4℃长时间保存时可能会出现凝胶状物质, 37℃溶解不了, 可将其 60℃左右水浴 10 分钟即可完全溶解; 甲液、乙液应防止磷污染。				
试剂六	液体	50mL×1瓶	50mL×2瓶	室温
试剂七	10mmol/L 标准磷贮备液	5mL×1瓶	5mL×1瓶	4℃
试剂十	贮备液	0.1mL×2支	0.1mL×4支	4℃
	稀释液	0.9mL×2支	0.9mL×4支	4℃
试剂十的配制: 取一支试剂十稀释液加入一支试剂十贮备液中, 用不完的4℃保存。				
	双蒸水	40mL×1瓶	40mL×1瓶	4℃或室温
0.1μmol/mL标准磷应用液的配制: 用时将10mmol/L磷贮备液100倍稀释, 即取0.1mL加双蒸水至10mL。				
0.02μmol/mL磷标准液的配制: 用时将0.1μmol/mL磷标准液用双蒸水5倍稀释, 即取0.1μmol/mL磷标准液1mL加双蒸水4mL。				
基质液的配制: 按试剂一: 试剂二: 试剂三=260: 80: 80 比例混合。需多少配多少, 现用现配。				
显色剂的配制: 用时取一瓶试剂五甲液加入一瓶已预温好试剂五乙液中, 充分混匀, 需提前 0.5 小时配制, 2~8℃条件下至少可保存 5 天, 配好的显色剂的量够做 13 个管 (如果你的样本数量很少, 那么你可以按试剂五的甲液: 乙液=7: 6 的比例自行配制显色剂, 需多少配多少 (按比例配制显色剂时要防止磷污染, 最好用专用吸嘴)。				

三、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿, 涡旋混匀器。37℃水浴锅或恒温箱, 离心

地址: 武汉市东湖新技术开发区高科园二路盛齐安生物产业园 4 号楼



机，双蒸水（或去离子水），蛋白测定试剂（本公司有售 BC016）。

四、样本的前处理：

1、组织的前处理：（组织匀浆上清液的制备参考实验方法学）

准确称取组织重量，按重量（g）：体积（mL）=1:9 的比例，加入 9 倍体积的生理盐水，冰水浴条件下机械匀浆，2500 转/分，离心 10 分钟，取上清液（即 10%的匀浆上清液），再用生理盐水 10 倍稀释成 1%，同时用考马斯亮蓝试剂测定组织蛋白（试剂本所有售）。如果预试结果太高，再将 1%的组织匀浆稀释成不同浓度再进行预试后再决定取样浓度。

2、培养细胞的前处理：将培养细胞消化，离心，弃上清，留下层细胞，每管加 0.2~0.3mL 生理盐水或匀浆介质制备成 $10^7/cm^3$ 细胞悬液，即 $10^7/mL$ ，再进行破碎。破碎细胞的方法有三种：①、用匀浆器匀浆。②、用超声粉碎机粉碎。③、反复冻溶 3 次（第③种方法有时会影响酶活力）。制备好的细胞悬液不需要离心，同时用考马斯亮兰试剂测定组织蛋白（试剂本所有售）。再将细胞匀浆液稀释成不同浓度进行预试，根据预试结果决定取样浓度。

[注 1]：在测试加样前要摇匀后取样。

[注 2]：不可用磷酸盐缓冲液或含磷的试剂作为样本匀浆或稀释样本。

[注 3]：预试结果将绝对吸光度值（A 测定—A 对照）控制在 0.2 左右为宜。

五、规范操作步骤：

1、酶促反应：

	对照管	测定管
双蒸水（mL）	0.16	0.12
样本（mL）		0.1
试剂十（mL）		0.04
试剂一（mL）	0.26	0.26
试剂二（mL）	0.08	0.08
试剂三（mL）	0.08	0.08
混匀，37°C准确反应 10 分钟		
试剂四（mL）	0.1	0.1
样本（mL）	0.1	
混匀，3500 转/分，离心 10 分钟，取上清定磷		

2、定磷反应：

	空白管	标准管	对照管	测定管
双蒸水（mL）	0.3			
0.02 μ mol/mL 磷标准液（mL）		0.3		
上清液（mL）			0.3	0.3
显色剂（mL）	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀，室温静置 2 分钟				
试剂六（mL）	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀，37°C静置 5-10 分钟，在 636nm 处，1cm 光径，双蒸水调零，测各管吸光度值				

[注]：在比色前，将比色皿用自来水冲洗 10 余次，再用双蒸水冲洗 4~5 次，以免磷污染。

六、如果你的样本数量很多可以采用简便操作法：

1、酶促反应(基质液配制见第一项)。

	对照管	测定管
双蒸水（mL）	0.16	0.12



样本 (mL)		0.1
试剂十 (mL)		0.04
基质液 (mL)	0.42	0.42
混匀, 37°C准确反应 10 分钟		
试剂四 (mL)	0.1	0.1
样本 (mL)	0.1	
混匀, 3000 ~ 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清定磷		

2、定磷反应:

	空白管	标准管	对照管	测定管
双蒸水 (mL)	0.3			
0.02μmol/mL 磷标准液 (mL)		0.3		
上清液 (mL)			0.3	0.3
显色剂 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀, 室温静止 2 分钟				
试剂六 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀, 37°C静置 5-10 分钟, 在 636nm 处, 1cm 光径, 双蒸水调零, 测各管吸光度值 A				

[注]: 在比色前, 将比色皿用自来水冲洗 10 余次, 再用双蒸水冲洗 4 ~ 5 次, 以免磷污染。

七、计算公式及举例:

1、定义: 规定每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。即微摩尔磷/毫克蛋白/小时 (μmolPi/mgprot/hour)。

2、计算公式:

$$\text{NaK - ATP酶活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{60}{T} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div \text{Cpr}$$

C_{标准}为磷标准液浓度, 0.02μmol/mL;

T 为酶促反应时间, 10 分钟;

V_{反应}为酶促反应体系总体积, 0.78mL;

V_样为取样量, 0.1mL;

Cpr 为样本蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

3、计算举例:

取 0.1% 的小鼠肝组织匀浆按操作表进行检测, 测得空白管吸光度为 0.052, 标准管吸光度为 0.255, 对照管吸光度为 0.280, 测得 Na⁺K⁺-ATPase 管吸光度为 0.378。同时测得 0.1% 的小鼠肝组织匀浆蛋白含量为 0.0998mgprot/mL。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{NaK - ATP酶活力 (U/mgprot)} &= \frac{0.378 - 0.280}{0.255 - 0.052} \times 0.02 \times 6 \times 7.8 \div 0.0998 \\ &= 4.528 \text{U/mgprot} \end{aligned}$$

八、测定意义:

ATP 酶存在于组织细胞及细胞器的膜上, 是生物膜上的一种蛋白酶, 它在物质运送、能量转换以及信息传递方面具有重要的作用, 机体在缺氧及一些疾病状态下, 此酶活力发生一系列改变, 另外有些遗传疾病也与此酶活力有关。

