



Na⁺ K⁺-ATP 酶活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC0065

规格: 100T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	2-8°C 保存
试剂二	液体 4 mL×1 瓶	2-8°C 保存
试剂三	粉剂×2 支	-20°C 保存
试剂四	液体 2 mL×1 瓶	2-8°C 保存
试剂五	液体 3 mL×1 瓶	2-8°C 保存
试剂六	粉剂×1 瓶	2-8°C 保存
试剂七	粉剂×1 瓶	2-8°C 保存
试剂八	液体 5 mL×1 瓶	常温保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8°C 保存

溶液的配制:

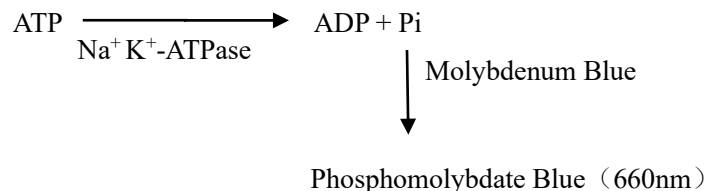
- 1、试剂三: 临用前取 1 支加 1 mL 蒸馏水溶解, 现用现配。用不完的试剂-20°C 分装保存一周。
- 2、试剂六: 用时加入 5 mL 蒸馏水, 溶解后 2-8°C 保存两周。
- 3、试剂七: 用时加入 5 mL 蒸馏水, 溶解后 2-8°C 保存两周。
- 4、标准品: 10 μmol/mL 标准磷贮备液。将标准品 20 倍稀释, 即取 0.1 mL 标准品加 1.9 mL 蒸馏水充分混匀, 配成 0.5 μmol/mL 标准磷应用液, 现用现配。
- 5、定磷剂的配制: 按 H₂O:试剂六:试剂七:试剂八=2:1:1:1 (体积比) 的比例配制, 配好的定磷剂应为浅黄色。若无色则试剂失效, 若是蓝色则为磷污染, 定磷剂根据实验用量现用现配。

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。

产品说明:

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。

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。



注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、细菌、细胞或组织样本的制备:

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; 按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 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: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清（浆）样本: 直接检测。

二、测定步骤

1、可见分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 660nm, 可见分光光度计需用蒸馏水调零。

2、酶促反应（在 EP 管中加入下列试剂）

试剂名称	对照管	测定管
试剂一 (μL)	65	45
试剂二 (μL)	40	40
试剂三 (μL)	20	20
试剂四 (μL)	-	20
样本 (μL)	-	100
混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 准确水浴 10min		
试剂五 (μL)	25	25
样本 (μL)	100	-
混匀, 4000g, 常温离心 10min, 取上清液		

3、定磷

试剂名称	空白管	标准管	对照管	测定管
0.5μmol/mL 标准磷应用液 (μL)	-	20	-	-
上清液 (μL)	-	-	20	20
蒸馏水 (μL)	20	-	-	-
定磷试剂 (μL)	200	200	200	200
涡旋混匀, 置于 40℃水浴锅中准确水浴 10min, 在 660nm 处, 记录各管吸光值。分别记为 A 空白、A 标准、A 对照、A 测定。每个测定管需设一个对照管, 标准管和空白管只需测 1-2 次。				

三、Na⁺K⁺-ATP 酶活计算

1、血清（浆）Na⁺K⁺-ATPase 活力的计算:

定义: 规定每小时每毫升血清（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。

$$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力 (U/mL)} = C_{\text{标}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 7.5 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})$$

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: 规定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。

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

(2) 按样本质量计算:

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

$$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力 (U/g 质量)} = \text{C 标} \times (\text{A 测定-A 对照}) \div (\text{A 标准-A 空白}) \times \text{V 总} \div (\text{V 样} \div \text{V 样总} \times \text{W}) \div \text{T} \\ = 7.5 \times (\text{A 测定-A 对照}) \div (\text{A 标准-A 空白}) \div \text{W}$$

(3) 按细菌或细胞数量计算:

定义: 规定每小时每 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。

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

C 标: 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: 加入试剂一体积, 1mL; T: 反应时间, 1/6 小时; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

注意事项:

- 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。

实验实例:

- 1、取 0.1g 小鼠心脏加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。8000g 4°C离心 10min, 取上清置冰上, 之后用 96 孔板按照测定步骤操作, 测得计算 A 测定=0.741, A 对照=0.509, A 标准=0.280, A 空白=0.043, 按样本质量计算酶活得:

$$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力(U/g 质量)} = 7.5 \times (\text{A 测定-A 对照}) \div (\text{A 标准-A 空白}) \div \text{W} = 73.42 \text{ U/g 质量。}$$

- 2、取 0.1g 稗草加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。8000g 4°C离心 10min, 取上清置冰上, 之后用 96 孔板按照测定步骤操作, 测得计算 A 测定=0.275, A 对照=0.239, A 标准=0.280, A 空白=0.043, 按样本质量计算酶活得:

$$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力(U/g 质量)} = 7.5 \times (\text{A 测定-A 对照}) \div (\text{A 标准-A 空白}) \div \text{W} = 11.39 \text{ U/g 质量。}$$

- 3、取 100μL 小鼠血浆检测, 用 96 孔板测得 A 测定=1.114, A 对照=1.054, A 标准=0.280, A 空白=0.043, 按液体体积计算酶活得:

$$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力 (U/mL)} = 7.5 \times (\text{A 测定-A 对照}) \div (\text{A 标准-A 空白}) = 1.90 \text{ U/mL。}$$

相关发表文献:

[1] Fangzhou Chen, Ying Zhao, Huizhao Chen, et al. MicroRNA-98 reduces amyloid β-protein production and improves oxidative stress and mitochondrial dysfunction through the Notch signaling pathway via HEY2 in Alzheimer's disease mice. International Journal of Molecular Medicine. October 2018;(IF2.928)

[2] Wanxiu Cao, Jing Li, Yaoxian Chin, et al. Transcriptomic analysis reveals effects of fucoxanthin on intestinal glucose transport. Journal of Functional Foods. October 2018;(IF3.197)

[3] Li M, Jiang C, Zhang Y, et al. Activities of Amphioxus GH-like protein in osmoregulation: insight into origin of vertebrate GH family[J]. International journal of endocrinology, 2017, 2017.

参考文献:

[1] Luo L G, MacLean D B. Effects of thyroid hormone on food intake, hypothalamic Na/K ATPase activity and ATP content[J]. Brain research, 2003, 973(2): 233-239.

[2] Cornelius F. Modulation of Na, K-ATPase and Na-ATPase activity by phospholipids and cholesterol. I. Steady-state kinetics[J]. Biochemistry, 2001, 40(30): 8842-8851.

相关系列产品:

BC0960/BC0965 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活性检测试剂盒

BC0300/BC0305 ATP 含量检测试剂盒