

Na⁺K⁺-ATP 酶活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: BC0060

规格: 50T/24S

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 30 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 3mL×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 15 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:

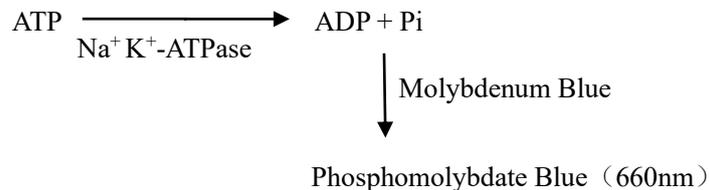
- 1、试剂三: 用时取 1 支加 1 mL 蒸馏水, 现用现配。用不完的试剂-20°C分装保存一周。
- 2、试剂六: 用时加入 15 mL 蒸馏水, 溶解后 2-8°C保存两周。
- 3、试剂七: 用时加入 15 mL 蒸馏水, 溶解后 2-8°C保存两周。
- 4、标准品: 10 μmol/mL 标准磷贮备液。将标准品 20 倍稀释, 即取 0.1 mL 标准品加 1.9 mL 蒸馏水充分混匀, 配成 0.5 μmol/mL 标准磷应用液。
- 5、定磷剂的配制: 按 H₂O: 试剂六: 试剂七: 试剂八=2:1:1:1 (体积比) 的比例配制, 配好的定磷剂应为浅黄色。若变色则试剂失效, 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、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、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、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）

试剂名称	对照管	测定管
试剂一（μL）	130	90
试剂二（μL）	80	80
试剂三（μL）	40	40
试剂四（μL）	-	40
样本（μL）	-	200
混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确水浴 10min		
试剂五（μL）	50	50
样本（μL）	200	-
混匀，4000g，常温离心 10min，取上清液		

3、定磷(在 1.5mL EP 管中依次加入下列试剂)

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）	-	100	-	-
上清液（μL）	-	-	100	100
蒸馏水（μL）	100	-	-	-
定磷试剂（μL）	1000	1000	1000	1000
混匀，40℃水浴 10 min，冷却至室温，在 660nm 处比色。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。

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

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

C 标: 标准管浓度, 0.5μmol/mL; V 总: 酶促反应总体积, 0.5mL; V 样: 加入样本体积, 0.2mL; 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 50 管保证测 24 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, 之后按照测定步骤操作, 测得计算 A 测定=1.216, A 对照=0.842, A 标准=0.398, A 空白管=0.004, 按样本质量计算酶活得:
Na⁺K⁺-ATP 酶活力(U/g 质量)=7.5×(A 测定-A 对照)÷(A 标准-A 空白)÷W=71.19 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, 之后按照测定步骤操作, 测得计算 A 测定=0.474, A 对照=0.403, A 标准=0.398, A 空白=0.004, 按样本质量计算酶活得:
Na⁺K⁺-ATP 酶活力(U/g 质量)=7.5×(A 测定-A 对照)÷(A 标准-A 空白)÷W=13.52 U/g 质量。
- 3、取 200μL 小鼠血浆稀释 2 倍, 直接检测, A 测定管=0.958, A 对照=0.906, A 标准=0.398, A 空白=0.004, 按液体体积计算酶活得:
Na⁺K⁺-ATP 酶活力 (U/mL) =7.5×(A 测定-A 对照)÷(A 标准-A 空白)×2(稀释倍数)=1.98 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