Na^+K^+-ATP 酶活性测定试剂盒

微板法

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

使用说明书

货号：JL-T0659　　**有 效 期：**6 个月

规格：48T(20S)/96T(44S)　　**保存温度：**2-8℃和-20℃

实验原理：

Na^+K^+-ATP 酶广泛分布于植物、动物、微生物和细胞中，根据 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 酶活性高低。

检测范围：0.058-71μmol/h/mL　　灵敏度 0.058μmol/h/mL

注意事项：

1. 不能使用过期产品，不同货号和批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

产品组成：

试剂名称	规格（48T/20S）	规格（96T/44S）	保存条件
提取液	55mL×1 瓶	110mL×1 瓶	2-8℃
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃，避光
试剂二	2mL×1 瓶	4mL×1 瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃
试剂四（A）	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃，避光
试剂四（B）	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃，避光
试剂四（C）	14.4mL×1 瓶	28.8mL×1 瓶	室温
标准品	1mL×1 瓶	1mL×2 瓶	2-8℃

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、水浴锅。

样本处理及要求：

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**，建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.058-71μmol/h/mL，如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩，样本的稀释液为蒸馏水。

2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。

3. **细菌、细胞样本：**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）；10000 g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

4. **组织样本：**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。10000 g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

5. **血清（浆）等液体样本**：直接测定。

检测前准备工作：

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温，

2. 试剂一：临用前取一支加入 3mL 蒸馏水充分混匀待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

3. 试剂三：临用前取一瓶加入 3mL 蒸馏水。

4. 试剂四（A）：临用前取一瓶加入 12.5mL 蒸馏水，溶解后 2-8℃保存一周。

5. 试剂四（B）：临用前取一瓶加入 12.5mL 蒸馏水，溶解后 2-8℃保存一周。

6. 定磷剂的配制：按蒸馏水：试剂四（A）：试剂四（B）：试剂四（C）=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。

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。

7. **标准品溶液的配制**：把标准品母液(10μmol/mL)用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0μmol/mL、0.2μmol/mL、0.4μmol/mL、0.6μmol/mL、0.8μmol/mL、1μmol/mL、2μmol/mL、3μmol/mL。（注：配制目标浓度的标准品工作液时，每次请根据表格从标准品母液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。）

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1	2	3
10μmol/mL 标准品(μL)	0	10	20	30	40	50	100	150
蒸馏水(μL)	500	490	480	470	460	450	400	350

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用蒸馏水稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

操作步骤：

1. **酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 660nm。**

2. **样本测定酶促反应（在 EP 管中依次加入）：**

试剂名称(μL)	对照管	测定管
提取液	65	45
试剂一	60	60
试剂二		20
样本		100
混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确水浴（或者孵育）10min。		
试剂三	25	25
样本	100	
混匀，10000 g，25℃离心 10min，取上清液。		

3. **定磷（在 96 孔板中依次加入）:**

试剂名称(μL)	标准孔	对照孔	测定孔
标准品	20		
上清液		20	20
定磷试剂	200	200	200
混匀，室温放置 3min 在 660nm 处读取各孔的 OD 值。			

注:

1.每一个样本都必须做一个对照组。

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。避免磷污染是检测成败的关键。

实验结果结算：

1. **标准品拟合曲线：**y=ax+b。

2. **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。

Na^+K^+-ATP 酶活力（μmol/h/mL）=(△A-b)÷a×$V_{总}$÷$V_{样}$÷T×N=15×(△A-b)÷a×N

3. **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。

Na^+K^+-ATP 酶活力（μmol/h/mg prot）=(△A-b)÷a×$V_{总}$÷（Cpr×$V_{样}$）÷T×N=15×(△A-b)÷a÷Cpr×N

（2）**按样本鲜重计算：**

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。

Na^+K^+-ATP 酶活力(μmol/h/g 质量)=(△A-b)÷a×$V_{总}$÷($V_{样}$÷$V_{提取}$×W)÷T×N=15×(△A-b)÷a÷W×N

（3）**按细菌或细胞密度计算：**

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。

Na^+K^+-ATP 酶活力(μmol/h/10^4cell)=(△A-b)÷a×$V_{总}$÷($V_{样}$÷$V_{提取}$×500)÷T×N=0.03×(△A-b)÷a×N

注:

y：标准管 OD 值–空白管 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

$V_{样}$：加入样本体积，0.1mL

$V_{提取}$：加入提取液体积，1mL

△A：测定管 OD 值–对照管 OD 值

$V_{总}$：酶促反应总体积，0.25mL

T：反应时间，1/6 小时

N：样本稀释倍数

500：细菌或细胞总数，500 万

W：样本质量，g

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL

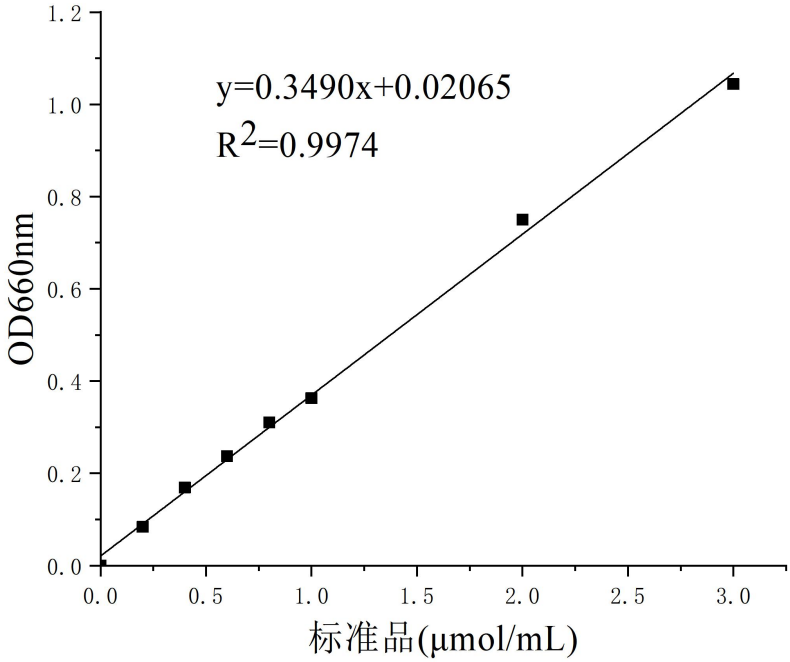
参考样本数据：

以下数据仅供参考：

样本类型	稀释倍数	参考值
大鼠心脏（10%匀浆）	不稀释	87.625μmol/h/g
大鼠肝脏（10%匀浆）	不稀释	125.829μmol/h/g
大鼠肾脏（10%匀浆）	不稀释	141.419μmol/h/g

参考曲线：

y=0.3490x+0.02065,R^2=0.9974,x 是标准品的浓度（μmol/mL），y 是△A。



注意：本图仅供参考，应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。

Note:

咨询电话：400-0066-400

传　　真：021-55660885

电子邮箱：shjlsw@163.com

网　　址：www.jonln.com