

Na⁺K⁺-ATP 酶检测试剂盒

(货号: BC025 比色法)

一、测定意义及原理

ATP 酶存在于组织细胞及细胞器的膜上, 机体在缺氧及疾病状态下, ATP 酶受到损伤, 活力下降。ATP 酶活力的大小是各种细胞能量代谢及功能有无损伤的重要指标。

样品中的 atpase 与底物反应, 最终产生无机磷, 通过定无机磷的含量来计算出样品中的 atpase 活性。

【本法优点】超微量 atpase 试剂盒在原有 atpase 测试方法上做了改进, 大大提高了其灵敏度, 基本上是普通 atpase 测试方法的 100 倍。

【测试方法】化学比色法。

【所需仪器】恒温水浴箱, 离心机, 可见光分光光度计/全自动/半自动生化分析仪/酶标仪(可用其中之一进行比色)。

二、试剂组成及配制 (48T)

	组分	24T (50 Assay)	48T (100Assay)	储存
试剂一	液体	13ml*1 瓶	13ml*2 瓶	4°C保存 6 个月
试剂二	液体	4ml*1 瓶	4ml*2 瓶	4°C保存 6 个月
试剂三	粉剂	粉剂*4 瓶	粉剂*8 瓶	-20°C保存 6 个月
试剂三的配制: 用时每支试剂三粉剂加双蒸水 1ml, 充分溶解。(配置好的工作液, 用不完的-20°C以下可以保存一周时间, 过期后请勿在用)				
试剂四	液体	5ml*1 瓶	5ml*2 瓶	4°C保存 6 个月
试剂五	A 液	7ml*4 瓶	7ml*8 瓶	4°C保存 6 个月
	B 液	6ml*4 瓶	6ml*8 瓶	4°C避光保存 6 个月
注意: 试剂五 A 液在冬天或 4°C长时间保存可能会出现凝胶状物质, 37°C无法溶解, 可将其置于 60°C水浴锅中 10min 左右即可完全溶解; A 液、B 液应严格防止磷污染。				
试剂六	液体	50ml*1 瓶	50ml*2 瓶	室温保存 6 个月
试剂七	10mmol/L 标准磷原液	5ml*1 瓶	5ml*1 瓶	4°C保存 6 个月
试剂十	原液	0.1ml*2 瓶	0.1ml*4 瓶	4°C保存 6 个月
	稀释液	0.9ml*2 瓶	0.9ml*4 瓶	4°C保存 6 个月
试剂十的配制: 取一支试剂十的稀释液加入一支试剂十的原液中, 用不完的 4°C保存				
双蒸水		40ml*1 瓶	40ml*1 瓶	4°C或室温保存
0.1μmol/ml 标准磷工作液 的配制: 用时将 试剂七 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 标准磷工作液 用双蒸水 5 倍稀释, 即取 0.1μmol/ml 标准磷工作液 1ml 然后加双蒸水 4ml				



基质液的配置：按试剂一：试剂二：试剂三 = 260：80：80 比例混合。需要多少即配制多少，现用现配。

显色剂的配制：用时取一瓶试剂五 A 液加入一瓶已经预温好的试剂五 B 液中，充分混匀，需提前 30min 配制，配置好的工作液 4℃条件下可保存一周，通常情况下配置好的显色剂的量够做 13 个管子（如若你的样本量很少，所需的显色剂量较少，那么可以按照试剂五中的 A 液：B 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必须使用一次性吸管或枪头，严格注意防止吸头共用造成磷污染。）

三、样本的前处理：

样本处理详见公司官网或联系销售获取 word 文档，使用本试剂盒测定时需要同时测定组织或是细胞的总蛋白浓度。可使用本公司的

四：操作步骤：

1、酶促反应

	对照管	样本测定管
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℃准确反应 10min		
试剂四	0.1	0.1
样本	0.1	
混匀，3500 转/分，离心 10min，取上清定磷		

2、定磷：（0.02μmol/ml 磷标准液及显色液的配制见第一页）

	空白管	标准管	对照管	样本测定管
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，室温静置 2min				
试剂六 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀，室温静置 5min，在 636nm 处，1cm 光径，双蒸水调零，测各管吸光度值。				
注意：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				



五：计算公式：

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 1 μ mol 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 (μ mol Pi/mgprot/hour)。

2、计算公式：

$$\text{组织、细胞中ATPase活力} \quad (U/mgprot) = \frac{\text{测定OD值}-\text{对照OD值}}{\text{标准品OD值}-\text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度} \quad (0.02\mu\text{mol/ml}) \times \text{反应体系稀释倍数} \quad (7.8^*)$$

$$\times \frac{\text{反应时间}}{(6^*)} \div \frac{\text{待测样品蛋白浓度}}{(mgprot/ml)}$$

注意：6*：定义为每小时，实际操作为 10min 反应；

注：稀释倍数即样本测定前处理过程中对样本的稀释倍数。或 7.8*为反应体系中 7.8 倍稀释

