

超微量 Na⁺K⁺ 、Ca²⁺Mg²⁺-ATP 酶测试盒

75 管/25 样

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：

	组份			保存
试剂一	液体	20ml×1 瓶	20ml×2 瓶	4℃保存 6 个月
试剂二	液体	4ml×2 瓶	4ml×4 瓶	4℃保存 6 个月
试剂三	粉剂	粉剂×6 支	粉剂×12 支	-20℃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。（用不完-20℃以下可保存一周。）				
试剂四	液体	5ml×2 瓶	5ml×4 瓶	4℃保存 6 个月
试剂五	甲液	7ml×6 瓶	7ml×12 瓶	4℃保存 6 个月
	乙液	6ml×6 瓶	6ml×12 瓶	4℃避光保存 6 个月
[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	80ml×1 瓶	80ml×2 瓶	室温保存 6 个月
试剂七	10mmol/L 标准磷贮备液	5ml×1 瓶	5ml×1 瓶	4℃保存 6 个月
试剂八	液体	4ml×2 瓶	4ml×3 瓶	4℃保存 6 个月
试剂九	粉剂	粉剂×4 支	粉剂×8 支	4℃保存 6 个月
	稀释液	0.5ml×4 支	0.5ml×8 支	4℃保存 6 个月
试剂九的配制：用时取一支试剂九稀释液加入一支试剂九粉剂中，充分混匀，用不完的 4℃保存。				
试剂十	贮备液	0.1 ml×3 支	0.1 ml×6 支	4℃保存 6 个月
	稀释液	0.9ml×3 支	0.9ml×6 支	4℃保存 6 个月
试剂十的配制：用时取一支试剂十稀释液加入一支试剂十储备液中，完全溶解，用不完的 4℃保存。				
双蒸水		40ml×1 瓶	40ml×1 瓶	4℃或室温保存
0.1 μmol/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。				
0.02 μmol/ml 磷标准液的配制：用时将 0.1 μmol/ml 磷标准液用双蒸水 5 倍稀释，即取 0.1 μmol/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 个管子（如果你的样本量很少，所需的显色剂的量较少，那么你可以按试剂五中的甲液：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、样本前处理：

样本处理详见说明书或本公司官网-技术文章部分关于样本处理的说明。测定组织和细胞同时需要测定蛋白浓度。可用总蛋白定量测试盒（考马斯亮蓝法）或者总蛋白定量测试盒(BCA 法)进行蛋白浓度的测定。

四、操作步骤：

1、酶促反应：

	对照管	Na ⁺ K ⁺ -ATPase 测定管	Ca ²⁺ Mg ²⁺ -ATPase 测定管
双蒸水 (ml)	0.16	0.12	
样本 (ml)		0.1	0.1
试剂八 (ml)			0.08
试剂九 (ml)			0.08
试剂十 (ml)		0.04	
试剂一 (ml)	0.26	0.26	0.26
试剂二 (ml)	0.08	0.08	0.08
试剂三 (ml)	0.08	0.08	0.08
混匀，37℃准确反应 10 分钟，			
试剂四 (ml)	0.1	0.1	0.1
样本 (ml)	0.1		
充分混匀，3500 转/分，离心 10 分钟，取上清定磷			

2、定磷：（0.02 μmol/ml 磷标准液及显色剂的配制见第一页）

	空白管	标准管	对照管	Na ⁺ K ⁺ -ATPase 测定管	Ca ²⁺ Mg ²⁺ -ATPase 测定管
双蒸水 (ml)	0.3				
0.02 μmol/ml 磷标准液 (ml)		0.3			
上清液 (ml)			0.3	0.3	0.3
显色剂 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀后，室温静置 2 分钟					
试剂六 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀，室温静置 5 分钟，在 636nm 处，1cm 光径，双蒸水调零，测各管吸光度值。					

五、计算与举例：

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：

$$\text{组织中 ATPase 活力} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \text{标准品浓度} \times 6^* \times 7.8^{**} \div \text{待测样本蛋白浓度}$$

(0.02 μmol / ml) (mgprot / ml)

[注]：6*：定义为每小时，实际操作为 10 分钟反应，所以必须乘以 6。

7.8**：反应体系中 7.8 倍稀释。