

Na⁺K⁺-ATP酶活性测定说明书

微量法 100管/48样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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。

自备实验用品及仪器：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体 10mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1瓶，-20℃保存；临用前加入6mL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。

试剂三：液体 2mL×1瓶，4℃保存。

试剂四：粉剂×1瓶，4℃保存。用时加入3mL蒸馏水，4℃保存。

试剂五：粉剂×1瓶，4℃保存。用时加入25mL蒸馏水，溶解后4℃保存一周。

试剂六：粉剂×1瓶，4℃保存。用时加入25mL蒸馏水，溶解后4℃保存一周。

试剂七：液体25mL×1瓶，室温保存。

试剂八：10mmol/L 标准磷贮备液 10mL×1瓶，4℃保存。

0.5μmol/mL 标准磷应用液配制：将试剂八 20倍稀释，即取 0.1mL试剂八加1.9mL蒸馏水充分混匀。

定磷剂的配制：按H₂O:试剂五:试剂六:试剂七=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。

样品酶液的制备：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

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；按照细菌或细胞数量（10⁴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）；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

组织：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。8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）样品：直接检测。

Na⁺K⁺-ATP酶活性测定说明书操作步骤

1、分光光度计或酶标仪预热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）

	对照管	测定管
试剂一（ μL ）	65	45
试剂二（ μL ）	60	60
试剂三（ μL ）		20
样本（ μL ）		100

混匀，37°C（哺乳动物）或25°C（其他物种）准确水浴10min

试剂四（ μL ）	25	25
样本（ μL ）	100	

混匀，8000g，25°C离心10min，取上清液

3、定磷（在EP管或96孔板中加入下列试剂）

	空白管	标准管	对照管	测定管
0.5 $\mu\text{mol/ml}$ 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

混匀，室温放置30min，在660nm处，记录各管吸光值。

注意：

- 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。
- 3、空白管和标准管只要做一管。

计算

1、血清（浆）Na⁺K⁺-ATPase活力的计算：

定义：每小时每毫升血清（浆）中Na⁺K⁺-ATP酶分解ATP产生1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

Na^+K^+ -ATP酶活力 ($\mu\text{mol/h/mL}$) = $[\text{C标准管} \times \text{V总}] \times (\text{A测定管}-\text{A对照管}) \div (\text{A标准管}-\text{A空白管}) \div \text{V样} \div \text{T} = 7.5 \times (\text{A测定管}-\text{A对照管}) \div (\text{A标准管}-\text{A空白管})$

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: 每小时每毫克组织蛋白中 Na^+K^+ -ATP酶分解ATP产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

Na^+K^+ -ATP酶活力($\mu\text{mol/h/mg prot}$) = $[\text{C标准管} \times \text{V总}] \times (\text{A测定管}-\text{A对照管}) \div (\text{A标准管}-\text{A空白管}) \div (\text{Cpr} \times \text{V样}) \div \text{T} = 7.5 \times (\text{A测定管}-\text{A对照管}) \div (\text{A标准管}-\text{A空白管}) \div \text{Cpr}$

(2) 按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织中 Na^+K^+ -ATP酶分解ATP产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

Na^+K^+ -ATP酶活力($\mu\text{mol/h/g}$ 鲜重) = $[\text{C标准管} \times \text{V总}] \times (\text{A测定管}-\text{A对照管}) \div (\text{A标准管}-\text{A空白管}) \div (\text{W} \times \text{V样} \div \text{V样总}) \div \text{T} = 7.5 \times (\text{A测定管}-\text{A对照管}) \div (\text{A标准管}-\text{A空白管}) \div \text{W}$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

定义: 每小时每1万个细菌或细胞中 Na^+K^+ -ATP酶分解ATP产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

Na^+K^+ -ATP酶活力($\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}$) = $[\text{C标准管} \times \text{V总}] \times (\text{A测定管}-\text{A对照管}) \div (\text{A标准管}-\text{A空白管}) \div (500 \times \text{V样} \div \text{V样总}) \div \text{T} = 0.015 \times (\text{A测定管}-\text{A对照管}) \div (\text{A标准管}-\text{A空白管})$

C标准管: 标准管浓度, $0.5\mu\text{mol/mL}$; V总: 酶促反应总体积, 0.25mL ; V样: 加入样本体积, 0.1mL ; V样总: 加入提取液体积, 1mL ; T: 反应时间, $1/6$ 小时; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL ; W: 样本鲜重, g ; 500: 细菌或细胞总数, 500万。