

## H+K+-ATP 酶测试盒

200 管/96 样

### 一、测试原理：

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。

H+K+-ATP 酶是一种能被钾专一激活而不被乌本苷抑制的 ATP 酶。

### 二、试剂组成与配制：

|   | 组份                     | 100 管/48 样 | 200 管/96 样 | 保存      |
|---|------------------------|------------|------------|---------|
| 试剂一   | 液体                     | 10ml×2 瓶   | 10ml×3 瓶   | 4℃ 保存   |
| 试剂二   | 液体                     | 7ml×1 瓶    | 7ml×2 瓶    | 4℃ 保存   |
| 试剂三   | 液体                     | 8ml×1 瓶    | 8ml×2 瓶    | 4℃ 保存   |
| 试剂四   | 粉剂                     | 粉剂×2 支     | 粉剂×4 支     | -20℃ 保存 |
| 试剂四的配制：用时每支试剂四粉剂加双蒸水至 5ml，现用现配，余下的-20℃ 以下可保存 1 周。 |                        |            |            |         |
| 试剂五   | 粉剂                     | 粉剂×2 支     | 粉剂×4 支     | 4℃ 保存   |
| 试剂五的配制：用时每支试剂五粉剂加双蒸水至 5ml，适当加热溶解，4℃ 保存。           |                        |            |            |         |
| 试剂六   | 液体                     | 3ml×1 支    | 3ml×2 支    | 4℃ 保存   |
| 试剂七   | 液体                     | 10ml×1 支   | 10ml×2 支   | 4℃ 保存   |
| 试剂七的配制：用时每支试剂七液体加双蒸水至 25ml，室温保存。                  |                        |            |            |         |
| 试剂八   | 粉剂                     | 粉剂×3 瓶     | 粉剂×5 瓶     | 4℃ 保存   |
| 试剂八的配制：用时每瓶试剂八加双蒸水至 40ml 溶解，溶解后 4℃ 可保存一周。         |                        |            |            |         |
| 试剂九   | 粉剂                     | 粉剂×1 瓶     | 粉剂×2 瓶     | 4℃ 保存   |
| 试剂九的配制：用时每瓶试剂九粉剂加双蒸水至 100ml 溶解，室温保存。              |                        |            |            |         |
| 试剂十   | 液体                     | 100ml×1 瓶  | 100ml×2 瓶  | 室温保存    |
| 试剂十<br>一  | 10mmol/L<br>标准品贮备<br>液 | 10ml×1 瓶   | 10ml×1 瓶   | 4℃ 保存   |

**0.5 μ mol/ml 标准液的配制:** 用时按 10mmol/L 标准贮备液: 双蒸水=1:19 的比例配制, 即取 0.5ml 加双蒸水定容至 10ml。

**定磷剂的配制:** 按双蒸水: 试剂十: 试剂八: 试剂九=2:1:1:1 的比例配制。配好的定磷剂应为浅黄色, 若无色则试剂无效, 若蓝色则为磷污染, 定磷剂需现用现配。

### 三、样本前处理

准确称取组织重量, 按重量 (g): 体积 (ml)=1: 9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下制备成 10%的组织匀浆液, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。

### 四、操作步骤:

#### 1、酶促反应:

|  | 对照管 | 测定管 |
|--|-----|-----|
| 试剂一 (μl)                               | 130 | 130 |
| 试剂二 (μl)                               |     | 80  |
| 试剂三 (μl)                               | 120 |     |
| 试剂四 (μl)                               | 40  | 40  |
| 试剂五 (μl)                               | 40  | 40  |
| 试剂六 (μl)                               |     | 40  |
| 样 本 (μl)                               |     | 100 |
| 混匀 37℃水浴 10 分钟                         |     |     |
| 试剂七 (μl)                               | 50  | 50  |
| 样 本 (μl)                               | 100 |     |
| 混匀 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清 400 μl 上清定磷 |     |     |

#### 2、定磷:

| 管号                      | 标准管  | 对照管  | 测定管  |
|-------------------------|------|------|------|
| 0.5 μ mol/ml 标准应用液 (μl) | 400  |      |      |
| 对照管的上清液 (μl)            |      | 400  |      |
| 测定管的上清液 (μl)            |      |      | 400  |
| 定磷剂 (μl)                | 2000 | 2000 | 2000 |

混匀，45℃水浴 5 分钟，冷却至室温，660nm 处，1cm 光径，双蒸水调零，测各管吸光度值。

## 五、计算公式：

1、单位定义：规定每小时每毫克组织蛋白的 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 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 molPi/mgprot/hour)。

## 2、计算公式：

$$H^+K^+-ATPase \text{ 活力}(U/mgprot) = \frac{\text{测定 } OD \text{ 值} - \text{对照 } OD \text{ 值}}{\text{标准 } OD \text{ 值}} \times \text{标准品浓度} \times \text{反应体系中样本} \times \frac{60 \text{ 分钟}}{10 \text{ 分钟}} \div \text{待测样本蛋白浓度} \\ (0.5\mu mol/ml) \quad \text{稀释倍数}(4.8) \quad (mgprot/ml)$$

(蛋白浓度可通过用本所的 A045-2-1 总蛋白定量考马斯亮蓝法试剂盒测定)