

# Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP 酶活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：BC0060

规格：50T/24S

**产品组成：**使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

| 试剂名称 | 规格           | 保存条件   |
|------|--------------|--------|
| 试剂一  | 液体 30 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂二  | 液体 4 mL×1 瓶  | 2-8℃保存 |
| 试剂三  | 粉剂×2 支       | -20℃保存 |
| 试剂四  | 液体 2 mL×1 瓶  | 2-8℃保存 |
| 试剂五  | 液体 3mL×1 瓶   | 2-8℃保存 |
| 试剂六  | 粉剂×1 瓶       | 2-8℃保存 |
| 试剂七  | 粉剂×1 瓶       | 2-8℃保存 |
| 试剂八  | 液体 15 mL×1 瓶 | 常温保存   |
| 标准品  | 液体 1 mL×1 支  | 2-8℃保存 |

**溶液的配制：**

- 1、试剂三：用时取 1 支加 1 mL 蒸馏水，现用现配。用不完的试剂-20℃分装保存一周。
- 2、试剂六：用时加入 15 mL 蒸馏水，溶解后 2-8℃保存两周。
- 3、试剂七：用时加入 15 mL 蒸馏水，溶解后 2-8℃保存两周。
- 4、标准品：10 μmol/mL 标准磷贮备液。将标准品 20 倍稀释，即取 0.1 mL 标准品加 1.9 mL 蒸馏水充分混匀，配成 0.5 μmol/mL 标准磷应用液。
- 5、定磷剂的配制：按 H<sub>2</sub>O：试剂六：试剂七：试剂八=2:1:1:1（体积比）的比例配制，配好的定磷剂应为浅黄色。若变色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂根据实验用量现用现配。

**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。

**产品说明：**

Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-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。

Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-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。


Phosphomolybdate Blue (660nm)

**注意：**实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。





## 操作步骤:

### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

#### 1、细菌、细胞或组织样本的制备:

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; 按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 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: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

#### 2、血清(浆)样本: 直接检测。

### 二、测定步骤

#### 1、分光光度计预热 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)

| 试剂名称                                   | 对照管 | 测定管 |
|----------------------------------------|-----|-----|
| 试剂一 (μL)                               | 130 | 90  |
| 试剂二 (μL)                               | 80  | 80  |
| 试剂三 (μL)                               | 40  | 40  |
| 试剂四 (μL)                               | -   | 40  |
| 样本 (μL)                                | -   | 200 |
| 混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 准确水浴 10min |     |     |
| 试剂五 (μL)                               | 50  | 50  |
| 样本 (μL)                                | 200 | -   |
| 混匀, 4000g, 常温离心 10min, 取上清液            |     |     |

#### 3、定磷(在 1.5mL EP 管中依次加入下列试剂)

| 试剂名称                                                                                          | 空白管  | 标准管  | 对照管  | 测定管  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|
| 0.5μmol/mL 标准磷应用液 (μL)                                                                        | -    | 100  | -    | -    |
| 上清液 (μL)                                                                                      | -    | -    | 100  | 100  |
| 蒸馏水 (μL)                                                                                      | 100  | -    | -    | -    |
| 定磷试剂 (μL)                                                                                     | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| 混匀, 40℃水浴 10 min, 冷却至室温, 在 660nm 处比色。分别记为 A 空白、A 标准、A 对照、A 测定。每个测定管需设一个对照管, 标准管和空白管只需测 1-2 次。 |      |      |      |      |

### 三、Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP 酶活计算

#### 1、血清(浆) Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase 活力的计算:

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

$$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力 (U/mL)} = \frac{C_{\text{标}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})}{(A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})} \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 7.5 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})$$

#### 2、组织、细菌或细胞中 Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力 (U/mg prot)} = \frac{C_{\text{标}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})}{(A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})} \times V_{\text{总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F$$



$$=7.5 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr} \times F$$

(2) 按样本质量计算:

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

$$\begin{aligned} \text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力 (U/g 质量)} &= C_{\text{标}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times F \\ &= 7.5 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times F \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞数量计算:

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

$$\begin{aligned} \text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力 (U/10}^4\text{ cell)} &= C_{\text{标}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) \div T \times F \\ &= 7.5 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div N \times F \end{aligned}$$

C 标: 标准管浓度,  $0.5\mu\text{mol/mL}$ ; V 总: 酶促反应总体积,  $0.5\text{mL}$ ; V 样: 加入样本体积,  $0.2\text{mL}$ ; V 样总: 加入试剂一体积,  $1\text{mL}$ ; T: 反应时间,  $1/6$  小时; Cpr: 样本蛋白质浓度,  $\text{mg/mL}$ ; W: 样本质量, g; N: 细菌或细胞总数, 以万计; F: 样本稀释倍数。

**注意事项:**

- 1、由于每一个样都必须做对照, 本试剂盒 50 管保证测 24 份  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -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。

**实验实例:**

- 1、取  $0.1\text{g}$  小鼠心脏加入  $1\text{mL}$  试剂一进行冰浴匀浆。8000g  $4^\circ\text{C}$  离心 10min, 取上清置冰上, 之后按照测定步骤操作, 测得计算  $A_{\text{测定}}=1.216$ ,  $A_{\text{对照}}=0.842$ ,  $A_{\text{标准}}=0.398$ ,  $A_{\text{空白管}}=0.004$ , 按样本质量计算酶活得:  
 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力 (U/g 质量)} = 7.5 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W = 71.19 \text{ U/g 质量}。$
- 2、取  $0.1\text{g}$  稗草加入  $1\text{mL}$  试剂一进行冰浴匀浆。8000g  $4^\circ\text{C}$  离心 10min, 取上清置冰上, 之后按照测定步骤操作, 测得计算  $A_{\text{测定}}=0.474$ ,  $A_{\text{对照}}=0.403$ ,  $A_{\text{标准}}=0.398$ ,  $A_{\text{空白}}=0.004$ , 按样本质量计算酶活得:  
 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力 (U/g 质量)} = 7.5 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W = 13.52 \text{ U/g 质量}。$
- 3、取  $200\mu\text{L}$  小鼠血浆稀释 2 倍, 直接检测,  $A_{\text{测定管}}=0.958$ ,  $A_{\text{对照}}=0.906$ ,  $A_{\text{标准}}=0.398$ ,  $A_{\text{空白}}=0.004$ , 按液体体积计算酶活得:  
 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力 (U/mL)} = 7.5 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 2 (\text{稀释倍数}) = 1.98 \text{ U/mL}。$

**相关发表文献:**

- [1] Lei L, Zhang F, Huang J, Yang X, Zhou X, Yan H, Chen C, Zheng S, Si L, Jose PA, Zeng C, Yang J. Selenium deficiency causes hypertension by increasing renal AT1 receptor expression via GPx1/H2O2/NF- $\kappa$ B pathway. *Free Radic Biol Med.* 2023 May 1; 200:59-72. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.02.021. Epub 2023 Mar 2. PMID: 36868433; PMCID: PMC10164092.
- [2] Gao Y, Zhang H, Li X, Li L, Li F, Li T, Peng R, Wang C, Wang J, Liu X, Zhang S, Zhang J. NS1619 Alleviate Brain-Derived Extracellular Vesicle-Induced Brain Injury by Regulating BKca Channel and Nrf2/HO-1/NF- $\kappa$ B Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2022 Nov 23; 2022:2257427. doi: 10.1155/2022/2257427. PMID: 36466093; PMCID: PMC9711983.
- [3] Zhong X, Yue X, Cui J, Han R, Gao Y, Kang J. Complete mitochondrial genome sequencing and identification of candidate genes responsible for C5-type cytoplasmic male sterility in cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*). *Front Plant Sci.* 2022 Sep 26; 13:1019513. doi: 10.3389/fpls.2022.1019513. PMID: 36226295; PMCID: PMC9549296.





[4] Zeng M, Zhou H, He Y, Wang Z, Shao C, Yin J, Du H, Yang J, Wan H. Danhong injection alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by improving intracellular energy metabolism coupling in the ischemic penumbra. Biomed Pharmacother. 2021 Aug; 140:111771. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111771. Epub 2021 May 28. PMID: 34058441.

[5] Gao H, Li Z, Cheng C, Cui J, Peng J, Wang X, Zhang M, Hou Y, Bai G. Fuziline Ameliorates Glucose and Lipid Metabolism by Activating Beta Adrenergic Receptors to Stimulate Thermogenesis. Int J Mol Sci. 2023 May 6;24(9):8362. doi: 10.3390/ijms24098362. PMID: 37176069; PMCID: PMC10179377.

#### 参考文献:

[1] Luo L G, MacLean D B. Effects of thyroid hormone on food intake, hypothalamic Na/K ATPase activity and ATP content[J]. Brain research, 2003, 973(2): 233-239.

[2] Cornelius F. Modulation of Na, K-ATPase and Na-ATPase activity by phospholipids and cholesterol. I. Steady-state kinetics[J]. Biochemistry, 2001, 40(30): 8842-8851.

[3] Gorini A, Canosi U, Devecchi E. et al. ATPases enzyme activities during ageing in different types of somatic and synaptic plasma membranes from rat frontal cerebral cortex[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2002, 26(1): 81-90.

#### 相关系列产品:

BC0960/BC0965  $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATP 酶活性检测试剂盒

BC0300/BC0305 ATP 含量检测试剂盒



本产品仅供科学研究使用。请勿用于临床、诊断、食品、化妆品检测等用途。

For research use only. Do not use for clinical, diagnostic, food, cosmetic testing and other purposes.