天净沙系列

CAT#:EC7.2.2.13

低温运输，-20℃保存

天净沙

钠离子/钾离子交换 ATP 酶活性测定试剂盒

Na+/K+-Exchanging ATPase Assay Kit

使用手册 V0.8

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品用于测定钠离子/钾离子交换 ATP 酶（Na+/K+-Exchanging ATPase，Na(+)/K(+)-ATPase，7-EC7.2.2.13）活性。其原理是钠离子/钾离子交换 ATP 酶通过分解 ATP 来生成 ADP 和磷，磷在 660 nm 处有特征光吸收，故它在该波长下的光吸收变化速度可反映其在反应中的转换速度，即可计算出钠离子/钾离子交换 ATP 酶的活性。本产品具有如下特点：

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 最低检测限为 0.1 U，线性范围在 0.2-5 U 之间。
3. 本试剂盒 1 个酶活性单位的定义是在最适反应条件下，让测定物每分钟产生 1 μmol 变化所需的酶量。注意：同一 EC 号下面的各种酶可能有不同的最适反应条件，本产品是基于大肠杆菌 Na(+)/K(+)-ATPase 的最适反应条件开发。如果用户所测酶的最适反应条件与之不同，可联系本公司定做。
4. 本产品足够 100 次检测。
5. 本产品的起始材料是制备好的待测样本。本试剂盒不包括样本制备试剂，如果有需要可联系本公司另购。
6. 基于无机磷比色法检测，采用标准曲线法进行计算。
7. 本产品只可用于科研。（售前手册仅供参考，具体实验方案以出货手册为准。）

规格及成分

本产品采用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
Na(+)/K(+)-ATPase 底物干粉	7-EC7.2.2.13s	100 T	100 mL 本色瓶
Na(+)/K(+)-ATPase 反应液	7-EC7.2.2.13r	6 mL	125 mL 本色瓶
Na(+)/K(+)-ATPase 溶液 A	EC7.2.2.13a	5 mL	5 mL 本色瓶
Na(+)/K(+)-ATPase 溶液 B	EC7.2.2.13b	1.5 mL	1.5 mL 本色管
显色干粉 A	EC7.2.2.13c	100 T	5 mL 棕色瓶
显色干粉 B	EC7.2.2.13d	100 T	5 mL 棕色瓶
显色液 C	EC7.2.2.13e	5 mL	5 mL 棕色瓶
沉淀剂	EC7.2.2.13f	3 mL	5 mL 本色瓶
测定物标曲液 (10 μmol/mL)	7-EC7.2.2.13sd	2 mL	5 mL 本色瓶
使用手册	7-EC7.2.2.13sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂	待测样品，样本溶解液，超纯水，蛋白浓度测定试剂盒，比色皿及与之匹配的分光光度计，96 孔板及与之匹配的分光光度计。
使用方法	**一、首次使用本试剂盒时需要制备下列溶液。以下除试剂盒成份外，Na(+)/K(+)-ATPase 简称为酶。** 1. 底物工作液制备：将 Na(+)/K(+)-ATPase 底物干粉加入 5 mL 蒸馏水或去离子水溶解。-20℃下保存 7 天。 2. 显色液 A 和 B 的制备：将显色干粉 A 加入 5 mL 的蒸馏水或去离子水中溶解。将显色干粉 B 溶解在 5 mL 的蒸馏水或去离子水中。所得的显色液 A 和 B 可在 2-8℃的温度下避光保存，保存期限为 7 天。 3. 显色工作液（200 μL/反应）：将 80 μL 蒸馏水、40 μL 显色液 A、40 μL 显色液 B 以及 40 μL 显色液 C 充分混合即可，呈现淡黄色。该显色工作液应现场配制，并在当天用完。 **二、制备待测样本** 4. 用自选方式制备待测样本，记录下其总体积 V mL 便于后续计算酶比活性。待测样本的 pH 值最好在反应的最适 pH 附近，否则加入到反应中后可能会改变反应的 pH；待测样本中也不得含有高浓度的、在 660 nm 有光吸收的物质，不得含有能抑制 Na(+)/K(+)-ATPase 活性的成份，也不得含有能提高或降低测定物浓度的无关酶。 5. 预留 100 μL 待测样本（N 个样中随机取一个），100℃水浴 10 分钟灭活其中的酶，放冰上待用。此为酶阴性对照。如果酶耐热，不能热灭活，则用制备待测样本时所用的抽提液替代。 6. 用自备试剂测定待测样本的蛋白浓度，以备后续计算酶比活时使用。 **三、标曲制备** 7. 下面以制备 7 个浓度梯度的标曲液和 1 个空白对照为例。标记 0-7 号共 8 个 2 mL 离心管。用生理盐水（0.9% NaCl）将 10 μmol/mL 的测定物标曲液稀释成一系列不同浓度的溶液。推荐的稀释梯度为：0、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μmol/mL。 8. 在 7 号管中加入 700 μL 生理盐水和 300 μL 测定物标曲液。 9. 在 6 号管中加入 750 μL 生理盐水和 250 μL 测定物标曲液。 10. 在 5 号管中加入 800 μL 生理盐水和 200 μL 测定物标曲液。 11. 在 4 号管中加入加入 850 μL 生理盐水和 150 μL 测定物标曲液。 12. 重复上面的操作。0 号管对照管不需要加入标曲液。最后所得 0-7 号管中标曲液浓度分别为 0、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μmol/mL，放 37℃预热待用。

13. 将分光光度计开机预热 30 分钟，然后用超纯水调零。

14. 测定 8 个标曲液在 660 nm 的光吸收（以下简称 A 值），每个样本测定三次。

15. 数据处理：计算 1-7 号每个样本的平均 A 值，然后用每个样本的 A 值减去 0 号空白对照的 A 值即得 7 个样本的真实 A 值。

16. 绘制标曲：以标曲液浓度（μM）为横轴，以 A 值为纵轴，绘制标准曲线并得到线性回归方程式 A = aC + b，C 为标曲液浓度，A 为 A 值。

17. 此公式可在后续测试中反复使用，但在后续实验时必须设置 1 个质检点标曲液随待测样本一起测试。质控点标曲液的制备同上，其浓度必须在上步所得标曲的线性范围内，最好异于制备标曲所用的 6 个浓度。如果质控点的测试结果代入上步回归方程式得到的计算浓度跟其配制浓度相差在 10%以内，则可将同组的待测样本 A 值代入公式直接计算其对应的 C 值。如果相差大于 10%，则不能用此方程式，需同步制备新的标曲，得到新的回归方程式，再用其计算待测样本的 C 值。

四、样本测定

18. 按下表设置酶反应。酶阳性对照可以在首次实验或遇到问题需要查找原因时才使用。

成分	对照管	样本管
Na(+)/K(+)-ATPase 反应液	65 μL	45 μL
底物工作液	20 μL	20 μL
Na(+)/K(+)-ATPase 溶液 A	40 μL	40 μL
Na(+)/K(+)-ATPase 溶液 B	-	20 μL
待测样本	-	100 μL
混匀，将样本在 37℃培养 10 min		
沉淀剂	25 μL	25 μL
待测样本	100 μL	

19. 按下表设置显色反应

成分	对照孔	样本孔	标准孔
标准液	-	-	20 μL
对照管上清液	20 μL	-	-
样本管上清液	-	20 μL	-
显示工作液	200 μL	200 μL	200 μL

	20. 快速混匀 10 秒后放 37℃并计时，培养 15 分钟。最后在 660 nm 波长处测量每个孔的 OD 值。 **五、数据处理** 21. 从所有标准样本的读数中减去空白样本的平均 OD 值，得到的数值即为绝对 OD 值。 22. 以标准品的绝对 OD 值作为纵轴，以相应的浓度作为横轴，从而绘制出标准曲线。生成该标准曲线方程（y = ax + b）。 23. 血清/血浆及其他液体样本：酶活性(μmol Pi/mL/hour) = (ΔA660 - b) ÷ a × V1 ÷ V2 ÷ t × f 24. 组织样本：酶活性(μmol Pi/mgprot/hour) = (ΔA660 - b)÷ a × V1 ÷ (Cpr × V2) ÷ t × f 25. 注：ΔA660 为 OD 样本-OD 对照值；V1 反应总体积（0.25 mL）；V2 添加样本体积（0.1 mL）；t 酶反应时间（1/6 小时）；Cpr 样本中的蛋白质浓度，单位为 mgprot/mL。；f 测试前样品的稀释倍数
关联产品	钠离子/钾离子交换 ATP 酶抽提试剂盒