

H⁺K⁺-ATP 酶测试盒

100 管/48 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昔抑制的 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 一	10mmol/L 标准品贮备 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 $\mu\text{mol/ml}$ 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 $1 \mu\text{mol}$ 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 ($\mu\text{molPi/mgprot/hour}$)。

2、计算公式：

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

(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)