（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!）

**产品货号：E-BC-K122-S**

**产品规格：100 assays(50 samples)/200 assays(100 samples)**

**检测仪器：紫外-可见光分光光度计（660 nm）**

# Elabscience®氢钾 ATP 酶比色法测试盒

## $H^+K^+$-ATPase Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测动物组织、培养细胞中的氢钾 ATP 酶活力。

## 检测原理

ATP 酶可分解 ATP 产生 ADP 及无机磷，通过测定产物无机磷在单位时间内产生量来表示酶的活力。无机磷在酸性溶液中与钼酸铵反应生成磷钼酸铵复合物，用还原剂还原生成钼蓝，其在 660 nm 有吸收峰。测定钼蓝的浓度来计算出无机磷的量。

本试剂盒在检测样本时，需要测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：E-BC-K318-M）。

## 提供试剂和物品

| 编号 | 名称 | 规格 1<br>(Size 1)<br>(100 assays) | 规格 2<br>(Size 2)<br>(200 assays) | 保存方式<br>(Storage) |
|---|---|---|---|---|
| 试剂一<br>(Reagent 1) | 缓冲液<br>（Buffer Solution） | 20 mL×1 瓶 | 40 mL×1 瓶 | 2-8℃<br>保存 6 个月 |
| 试剂二<br>(Reagent 2) | 促进剂<br>(Accelerator) | 8 mL×1 瓶 | 16 mL×1 瓶 | 2-8℃<br>保存 6 个月 |
| 试剂三<br>(Reagent 3) | 酸试剂<br>（Acid Solution） | 8 mL×1 瓶 | 16 mL×1 瓶 | 2-8℃<br>保存 6 个月 |
| 试剂四<br>(Reagent 4) | 底物<br>（Substrate） | 粉剂×1 支 | 粉剂×2 支 | -20℃<br>保存 6 个月 |
| 试剂五<br>(Reagent 5) | 抑制剂<br>(Inhibitor) | 粉剂×1 支 | 粉剂×2 支 | 2-8℃<br>保存 6 个月 |
| 试剂六<br>(Reagent 6) | 络合剂<br>（Complexing Agent） | 6 mL×1 瓶 | 12 mL×1 瓶 | 2-8℃<br>保存 6 个月 |
| 试剂七<br>(Reagent 7) | 终止剂<br>（Stop Solution） | 10 mL×1 瓶 | 10 mL×2 瓶 | 2-8℃<br>保存 6 个月 |
| 试剂八<br>(Reagent 8) | 还原剂<br>（Reducing Agent） | 粉剂×2 瓶 | 粉剂×3 瓶 | 2-8℃避光<br>保存 6 个月 |
| 试剂九<br>(Reagent 9) | 显色剂<br>（Chromogenic Agent） | 粉剂×1 瓶 | 粉剂×2 瓶 | 2-8℃<br>保存 6 个月 |
| 试剂十<br>(Reagent 10) | 2.5 mol/L 硫酸 | 60 mL×1 瓶 | 60 mL×2 瓶 | 2-8℃<br>保存 6 个月 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | (2.5 mol/L Sulphuric Acid) | | | |
| 试剂十一<br>(Reagent 11) | 标准品储备液<br>(Standard Stock Solution) | 10 mL×1 瓶 | 10 mL×1 瓶 | 2-8℃<br>保存 6 个月 |

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

**仪器：**紫外-可见光分光光度计（660 nm）

**试剂：**双蒸水、生理盐水（0.9% NaCl）

## 试剂准备

① 检测前，将试剂平衡至室温。

② 试剂四应用液配制：

用时每支粉剂加5 mL双蒸水溶解：现用现配，余下的-20℃以下可保存一周。

③ 试剂五应用液配制：

用时每支粉剂加5 mL双蒸水，37℃溶解：现用现配，余下的4℃可保存一周。

④ 试剂七应用液配制：

向试剂七瓶中加入15 mL双蒸水，2-8℃保存3个月。

⑤ 试剂八应用液配制：

用时每瓶加入30 mL双蒸水溶解，2-8℃避光保存一周。

⑥ 试剂九应用液配制：

将试剂九用60 mL双蒸水溶解，2-8℃保存3个月（如有少量不溶粉末，直接取上清，不影响结果，）。

⑦ 定磷剂的配制：

按照$H_2O$：试剂十：试剂八应用液：试剂九应用液为2: 1: 1: 1的体积比配制，现用现配，配好的显色剂2-8℃避光保存1天。

⑧ 0.5 μmol/mL 标准品应用液配制：

按照试剂十一（10 μmol/mL标准磷储备液）：双蒸水为1: 19的体积比配制，现用现配，2-8℃保存1周。

⑨ 对照管及测定管应用液配制：

| | **对照管应用液** | **测定管应用液** |
|---|---|---|
| 试剂一（μL） | 130×（n+2） | 130×（n+2） |
| 试剂二（μL） | -- | 80×（n+2） |
| 试剂三（μL） | 120×（n+2） | -- |
| 试剂四应用液（μL） | 40×（n+2） | 40×（n+2） |
| 试剂五应用液（μL） | 40×（n+2） | 40×（n+2） |
| 试剂六（μL） | -- | 40×（n+2） |

**注：**① n 为所需测定的样本数，为了避免吸到最后试剂量不够，所以需多配制 2 管。

② 试剂六 2-8℃条件下有沉淀析出，直接取上清，不影响结果。

## 样本准备

### ① 样本处理

组织样本：匀浆介质为生理盐水（0.9% NaCl），进行匀浆后，4°C 10000 × g，离心 10 min 取上清待测。留取部分上清用于蛋白测定。

细胞样本：细胞样本使用生理盐水(0.9% NaCl)进行机械匀浆或超声破碎，4°C 10000 × g，离心 10 min 取上清待测。留取部分上清用于蛋白测定。

**注：**样本中不能用含磷试剂处理及 SDS、Tween20、NP-40、Triton X-100 等去污剂。

### ② 样本的稀释

在正式检测前，需选择样本之间差异较大的2-3例稀释成不同浓度进行预实验，不同样本稀释比例如下表（仅供参考）：

| 样本 | 稀释倍数 | 样本 | 稀释倍数 |
|---|---|---|---|
| 10%动物组织匀浆 | 5 | GES-1 细胞<br>（蛋白含量 2.52mg/mL） | 2 |

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

## 实验关键点

① 测定过程防止磷污染，检测过程中涉及到的装试剂的容器及试管要干净，最好使用一次性 EP 管或新玻璃试管。

② 待测样本的蛋白浓度不要高于 3 mg/mL。

## 操作步骤

### 酶促反应

① 对照管：取 330 μL 对照管应用液加入到 1.5 mL 管中；
测定管：取 330 μL 测定管应用液加入到 1.5 mL 管中。
② 向步骤①中测定管中加入 100 μL 待测样本；
③ 混匀，37℃ 孵育 10 min。
④ 向步骤③中的各管加入 50 μL 试剂七应用液。
⑤ 向步骤④中的对照管加入 100 μL 待测样本。
⑥ 混匀，2000 × g，离心 10 min，取 400 μL 上清定磷。

### 定磷

① 标准管：取 400 μL 0.5 μmol/mL 标准品应用液加入到标准管中。
对照管：取对照管中 400 μL 的上清到干净的 5 mL EP 管。
测定管：取测定管中 400 μL 的上清到干净的 5 mL EP 管。
② 向步骤①中的各管加入 2000 μL 定磷剂。
③ 混匀，45℃水浴 10 min ，冷却至室温。
④ 紫外分光光度计上，660 nm 处，1 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测定各管吸光度值。

## 操作表

### 酶促反应

| | 对照管 | 测定管 |
|---|---|---|
| 对照管应用液（μL） | 330 | -- |
| 测定管应用液（μL） | -- | 330 |
| 待测样本（μL） | -- | 100 |
| 混匀，37℃反应 10 min | | |
| 试剂七应用液（μL） | 50 | 50 |
| 待测样本（μL） | 100 | -- |
| 混匀，2000 × g，离心 10 min，取 400 μL 上清定磷 | | |

### 定磷

| | 标准管 | 对照管 | 测定管 |
|---|---|---|---|
| 0.5 μmol/mL 标准品应用液（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 10 min ，冷却至室温，660 nm 处，1 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测定各管吸光度值。 | | | |

**本试剂盒在检测样本时，需要测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：E-BC-K318-M）。**

## 结果计算

**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（1μmoL Pi/mgprot/hour）。

$$H^+K^+ATPase\ 活力\ （1\mu moL\ Pi/mgprot/hour） = \frac{A_2\text{-}A_1}{A_3} \times C \times 4.8^* \times 6^{**} \div C_{pr} \times f$$

**注解:**

$A_1$：对照管 OD 值

$A_2$：测定管 OD 值

$A_3$：标准管 OD 值

C：标准管浓度，0.5 μmol/mL

*：4.8 为反应体系中样本稀释倍数

$$反应体系中样本稀释倍数 = \frac{反应总体积}{取样量} = \frac{130+80+40+40+40+50+100}{100} = 4.8$$

**：反应时间为 10 min， 酶活定义为反应 1 小时，故需乘以 6

Cpr：待测样本蛋白浓度（mgprot/mL）

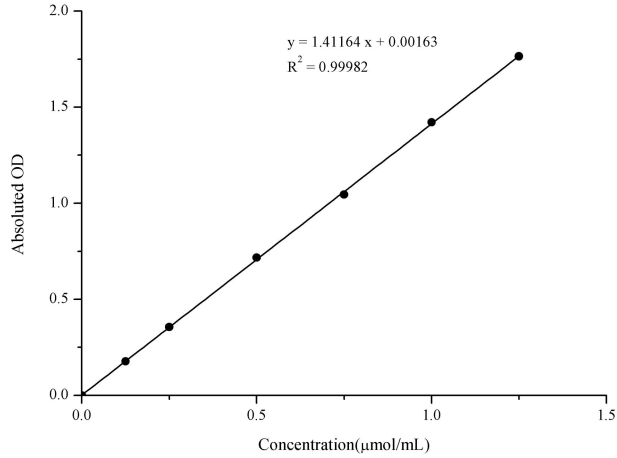
f：样本加入检测体系前的稀释倍数

# 附录1 关键数据

## 1. 技术参数

| 平均批间差 | 9.8 % | 平均批内差 | 4.4 % |
|---|---|---|---|
| 平均回收率 | 109 % | | |

## 2. 标准曲线(数据仅供参考)



# 附录2 实例分析

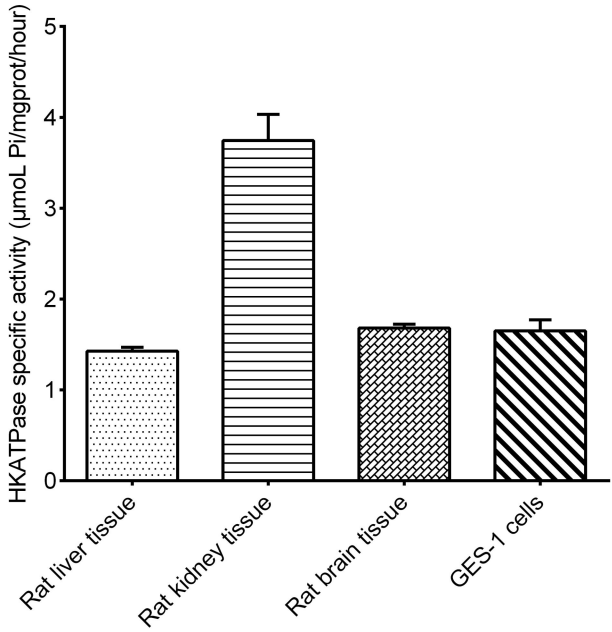
**例如检测大鼠肾组织(数据仅供参考):**

用生理盐水将10%大鼠肾匀浆稀释到2%的大鼠肾匀浆，取100 μL的2%大鼠肾匀浆，按说明书中操作表操作，结果如下：

对照管OD值为0.189，测定管OD值为0.455，标准管OD值为0.736，同时测定10%大鼠肾匀浆蛋白浓度为6.95 mgprot/mL，带入公式计算得：

$$H^+K^+\text{ATPase 活力} = \frac{0.455-0.189}{0.736} \times 0.5 \times 4.8 \times 6 \div 6.95 \times 5 = 3.74\ \mu\text{mol Pi/mgprot/hour}$$

按照说明书操作，测定大鼠肝脏组织（10%组织匀浆的蛋白含量15.87 mgprot/mL，稀释5倍，加样量100 μL）、大鼠肾脏组织（10%组织匀浆的蛋白含量6.95 mgprot/mL，稀释5倍，加样量100 μL）大鼠脑组织（10%组织匀浆的蛋白含量3.29 mgprot/mL，稀释5倍，加样量100 μL）及GES-1细胞（蛋白含量2.52 mgprot/mL，稀释2倍，加样量100 μL）中氢钾ATP酶的活力（如下图）：



## 附录3 问题答疑

| 问题 | 可能原因 | 建议解决方案 |
| --- | --- | --- |
| 复孔差异大 | 酶促反应时间不一致 | 保持操作一致,严格控制反应时间 |
| 样本测不出值 | 样本稀释倍数太大 | 选择合适稀释倍数,重新检测 |
| | 样本保存时间过长或者保存不当 | 取新鲜样本，重新检测 |

## 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

# 附录4 客户发表文献


1. Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. Nano Energy, 2021, 85:106004. IF:17.087
2. Bartolini D, Arato I, Mancuso F, et al. Melatonin modulates Nrf2 activity to protect porcine pre-pubertal Sertoli cells from the abnormal $H_2O_2$ generation and reductive stress effects of cadmium. J Pineal Res. 2022;73 (1):e12806. IF:13.007
3. Yang Z, Wang J, Ai S, et al. Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging[J]. Theranostics, 2019, 9(23): 6809. IF:11.556
4. Wan Q, Cao R, Wen G, et al. Sequential use of UV-LEDs irradiation and chlorine to disinfect waterborne fungal spores: Efficiency, mechanism and photoreactivation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 423:127102-. IF:10.588
5. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. J Adv Res. 2022. IF:10.479
6. Jg A, Jie S B, Jy B, et al. Comparative toxicity reduction potential of UV/sodium percarbonate and UV/hydrogen peroxide treatments for bisphenol A in water: An integrated analysis using chemical, computational, biological, and metabolomic approaches[J]. Water Research, 2020, 190. IF:9.702
7. Yang X X, Xu X, Wang M F, et al. A nanoreactor boosts chemodynamic therapy and ferroptosis for synergistic cancer therapy using molecular amplifier dihydroartemisinin[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2022, 20(1):1-19. IF:9.464
8. Liu Z, Liu X, Yang Q, et al. Neutrophil membrane-enveloped nanoparticles for the amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Acta Biomaterialia, 2020, 104: 158-166. IF:8.947
9. Huang S, Le H, Hong G, et al. An all-in-one biomimetic iron-small interfering RNA nanoplatform induces ferroptosis for cancer therapy. Acta Biomater. 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarrak SM, et al. Antioxidative, Antidiabetic, and Hypolipidemic Properties of Probiotic-Enriched Fermented Camel Milk Combined with Salvia officinalis Leaves Hydroalcoholic Extract in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. Antioxidants (Basel). 2022;11 (4):. IF:7.675