

(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<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-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](mailto:biochemical@elabscience.cn)

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

	(2.5 mol/L Sulphuric Acid)			
试剂十一 (Reagent 11)	标准品储备液 (Standard Stock Solution)	10 mL×1 瓶	10 mL×1 瓶	2-8°C 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°C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°C溶解：现用现配，余下的4°C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°C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°C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°C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<sub>2</sub>O：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°C避光保存1天。

⑧ 0.5  $\mu\text{mol/mL}$  标准品应用液配制：

按照试剂十一（10  $\mu\text{mol/mL}$ 标准磷储备液）：双蒸水为1:19的体积比配制，现用现配，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 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 ( $\mu\text{L}$ )	$130 \times (n+2)$	$130 \times (n+2)$
试剂二 ( $\mu\text{L}$ )	--	$80 \times (n+2)$
试剂三 ( $\mu\text{L}$ )	$120 \times (n+2)$	--
试剂四应用液 ( $\mu\text{L}$ )	$40 \times (n+2)$	$40 \times (n+2)$
试剂五应用液 ( $\mu\text{L}$ )	$40 \times (n+2)$	$40 \times (n+2)$
试剂六 ( $\mu\text{L}$ )	--	$40 \times (n+2)$

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，所以需要配制2管。

② 试剂六2-8 $^{\circ}\text{C}$ 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℃ 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℃ 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 (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  $\mu\text{L}$  对照管应用液加入到 1.5 mL 管中；  
测定管：取 330  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  待测样本；
- ③ 混匀，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min。
- ④ 向步骤③中的各管加入 50  $\mu\text{L}$  试剂七应用液。
- ⑤ 向步骤④中的对照管加入 100  $\mu\text{L}$  待测样本。
- ⑥ 混匀，2000  $\times g$ ，离心 10 min，取 400  $\mu\text{L}$  上清定磷。

### 定磷

- ① 标准管：取 400  $\mu\text{L}$  0.5  $\mu\text{mol/mL}$  标准品应用液加入到标准管中。  
对照管：取对照管中 400  $\mu\text{L}$  的上清到干净的 5 mL EP 管。  
测定管：取测定管中 400  $\mu\text{L}$  的上清到干净的 5 mL EP 管。
- ② 向步骤①中的各管加入 2000  $\mu\text{L}$  定磷剂。
- ③ 混匀，45 $^{\circ}\text{C}$  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 ( $\mu\text{L}$ )	330	--
测定管应用液 ( $\mu\text{L}$ )	--	330
待测样本 ( $\mu\text{L}$ )	--	100
混匀, $37^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min		
试剂七应用液 ( $\mu\text{L}$ )	50	50
待测样本 ( $\mu\text{L}$ )	100	--
混匀, $2000 \times \text{g}$ , 离心 10 min, 取 $400 \mu\text{L}$ 上清定磷		

### 定磷

	标准管	对照管	测定管
$0.5 \mu\text{mol/mL}$ 标准品应用液 ( $\mu\text{L}$ )	400	--	--
对照管的上清液 ( $\mu\text{L}$ )	--	400	--
测定管的上清液 ( $\mu\text{L}$ )	--	--	400
定磷剂 ( $\mu\text{L}$ )	2000	2000	2000
混匀, $45^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 冷却至室温, $660 \text{ nm}$ 处, $1 \text{ cm}$ 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  $\mu\text{mol}$  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（ $1\mu\text{mol Pi/mgprot/hour}$ ）。

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

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， $0.5 \mu\text{mol/mL}$

\*：4.8 为反应体系中样本稀释倍数

$$\text{反应体系中} \quad \frac{\text{反应总体积}}{\text{取样量}} = \frac{130+80+40+40+40+50+100}{100} = 4.8$$

\*\*：反应时间为 10 min，酶活定义为反应 1 小时，故需乘以 6

$C_{\text{pr}}$ ：待测样本蛋白浓度（ $\text{mgprot/mL}$ ）

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

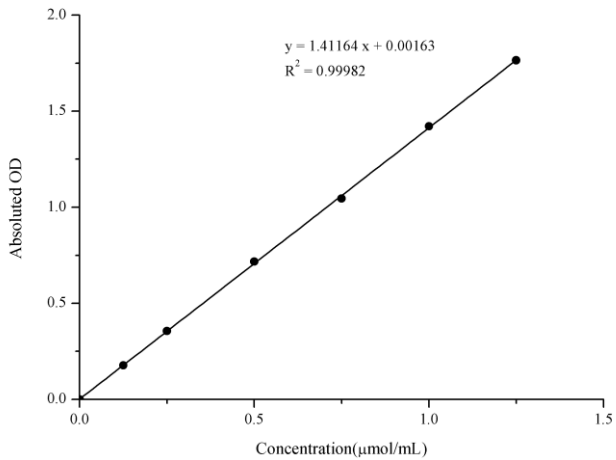


## 附录1 关键数据

### 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

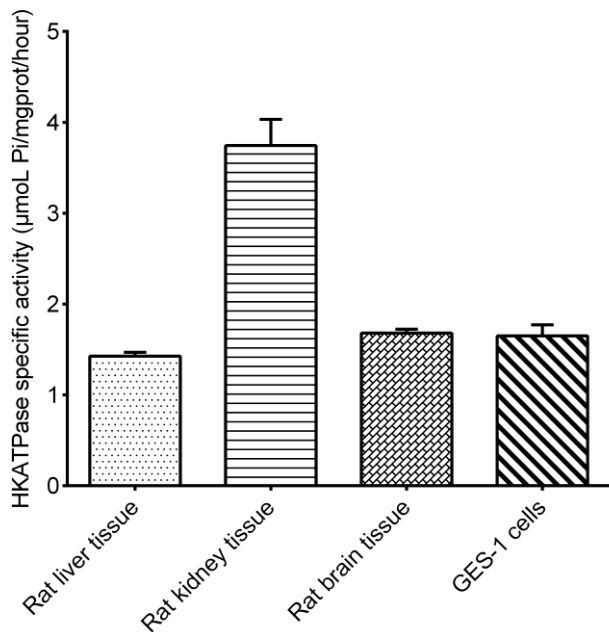
例如检测大鼠肾组织(数据仅供参考):

用生理盐水将10%大鼠肾匀浆稀释到2%的大鼠肾匀浆,取100  $\mu\text{L}$ 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:

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

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  $\mu\text{L}$ )、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  $\mu\text{L}$ )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  $\mu\text{L}$ )及GES-1细胞(蛋白含量2.52 mgprot/mL,稀释2倍,加样量100  $\mu\text{L}$ )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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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