

(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-K539-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(640-680 nm)

## Elabscience®Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP 酶比色法测试盒

### Na<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血清(浆)、动物组织样本中  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATP 酶活力。

## 检测原理

$\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATP 酶(EC3.6.1.37)是位于细胞膜上的一种糖蛋白,与 ATP 的分解和细胞内外钠、钾离子的转运密切相关,对维持多种细胞的正常机能状态,对人体的正常生理功能起着至关重要的作用。 $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATP 酶分解 ATP 产生 ADP 和磷,通过测定磷的含量来计算  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATP 酶活力

本试剂盒检测组织样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

## 提供试剂和物品

编号	名称	规格(Size) (96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	6 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	促进剂 A (Accelerant A)	5 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	粉剂×1 支	2-8℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	促进剂 B (Accelerant B)	1.5 mL×1 支	2-8℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	蛋白沉淀剂 (Protein Precipitator)	1.5 mL×2 支	2-8℃ 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	粉剂 A (Powder A)	粉剂×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	粉剂 B (Powder B)	粉剂×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	酸试剂 (Acid Reagent)	5 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂九 (Reagent 9)	10 μmol/mL 磷标准品 (10 μmol/mL Pi Standard)	2 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	

	样本位置标记表	1 张	
--	---------	-----	--

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：**酶标仪(640-680 nm, 最佳检测波长为 660 nm)、37℃ 恒温培养箱或 37℃ 恒温水浴锅

## 试剂准备

① 检测前，所有的试剂平衡至室温。

② 试剂三工作液配制：

取一支试剂三用5 mL双蒸水溶解，未用完部分-20℃保存7天。

③ 试剂六工作液配制：

取一瓶试剂六用5 mL双蒸水溶解，2-8℃避光保存7天。

④ 试剂七工作液的配制：

取一瓶试剂七用5 mL双蒸水溶解，2-8℃避光保存7天。

⑤ 显色剂工作液的配制：

将双蒸水：试剂六工作液：试剂七工作液：试剂八按2: 1: 1: 1的体积比混匀，现用现配，仅限当天使用。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度( $\mu\text{mol/mL}$ )	0	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
10 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品( $\mu\text{L}$ )	0	25	50	100	150	200	250	300
生理盐水( $\mu\text{L}$ )	1000	975	950	900	850	800	750	700

## 样本准备

### ① 样本处理

血清(浆)样本：可直接测定。

组织样本：按照样本质量(g)：体积(mL)为 1:9 的比例加入生理盐水(建议取 0.05 g 组织，加入 0.45 mL 生理盐水)，进行机械匀浆， $10000 \times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$  离心 10 min，取上清置于冰上待测。

### ② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围： $0.42\text{-}4.99 \mu\text{mol Pi/mL/hour}$ ，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠心脏组织	4-8	10%大鼠脾脏组织	4-8
10%大鼠肝脏组织	6-10	10%大鼠脑组织	4-8
大鼠血浆	不稀释		

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 配制完成的显色剂工作液应为淡黄色，若为其他颜色，则为磷污染。
- ③ 当样本  $\Delta A_{660}$  大于 0.160 时，需要稀释后再测。
- ④ 匀浆介质中不能含有磷酸盐。

## 操作步骤

### 酶促反应

- ① 对照管：取 65  $\mu\text{L}$  试剂一加入到 1.5 mL EP 管中；  
测定管：取 45  $\mu\text{L}$  试剂一加入到 1.5 mL EP 管中。
- ② 向①中各管加入 40  $\mu\text{L}$  试剂二，20  $\mu\text{L}$  试剂三工作液。
- ③ 向②中测定管加入 20  $\mu\text{L}$  试剂四，100  $\mu\text{L}$  待测样本。
- ④ 涡旋混匀 3 s，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min。
- ⑤ 向④中各管加入 25  $\mu\text{L}$  试剂五。
- ⑥ 向⑤中对照管加入 100  $\mu\text{L}$  待测样本。
- ⑦ 涡旋混匀 3 s，8000  $\times\text{g}$  离心 10 min，取上清液进行待测。

### 显色反应

- ① 标准孔：取 20  $\mu\text{L}$  不同浓度标准品，加入到对应的标准孔中；  
测定孔：取 20  $\mu\text{L}$  酶促反应测定管中的上清液，加入到测定孔中；  
对照孔：取 20  $\mu\text{L}$  酶促反应对照管中的上清液，加入到对照孔中。
- ② 向①中各孔加入 200  $\mu\text{L}$  显色剂工作液。
- ③ 酶标仪上振板 10 s，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min，660 nm 处，测各孔 OD 值。

## 操作表

### 酶促反应

	对照管	测定管
试剂一( $\mu\text{L}$ )	65	45
试剂二( $\mu\text{L}$ )	40	40
试剂三工作液( $\mu\text{L}$ )	20	20
试剂四( $\mu\text{L}$ )	--	20
待测样本( $\mu\text{L}$ )	--	100
涡旋混匀 3 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min		
试剂五( $\mu\text{L}$ )	25	25
待测样本( $\mu\text{L}$ )	100	--
涡旋混匀, 8000 $\times$ g 离心 10 min, 取上清液待测。		

### 显色反应

	标准孔	对照孔	测定孔
不同浓度标准品( $\mu\text{L}$ )	20	--	--
上清液( $\mu\text{L}$ )	--	20	20
显色剂工作液( $\mu\text{L}$ )	200	200	200
酶标仪上振板 10 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 660 nm 处, 测各孔 OD 值。			

本试剂盒检测组织样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

## 结果计算

标准品拟合曲线:  $y = ax + b$

测定血清(浆)样本:

定义: 规定每小时每毫升血清(浆)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单位, 即微摩尔磷/毫升/小时( $\mu\text{mol Pi/mL/hour}$ )。

$$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力} = (\Delta A_{660} - b) \div a \times V_1 \div V_2 \div t \times f$$

( $\mu\text{mol Pi/mL/hour}$ )

测定组织样本:

定义: 规定每小时每毫克组织蛋白中  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATP 酶分解 ATP 产生  $1 \mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活单位, 即微摩尔磷/毫克蛋白/小时( $\mu\text{mol Pi/mgprot/hour}$ )。

$$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶活力} = (\Delta A_{660} - b) \div a \times V_1 \div (C_{\text{pr}} \times V_2) \div t \times f$$

( $\mu\text{mol Pi/mgprot/hour}$ )

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品 OD 值为 0 时的 OD 值)

x: OD 值对应的标准品浓度

a: 标准曲线斜率

b: 标准曲线截距

$\Delta A_{660}$ : 测定孔 OD 值-对照孔 OD 值

$V_1$ : 反应体系总体积(0.25 mL)

$V_2$ : 加入样本体积(0.1 mL)

t: 酶促反应时间(1/6 h)

f: 样本的稀释倍数

$C_{\text{pr}}$ : 加入反应体系前样本的蛋白浓度(mgprot/mL)

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

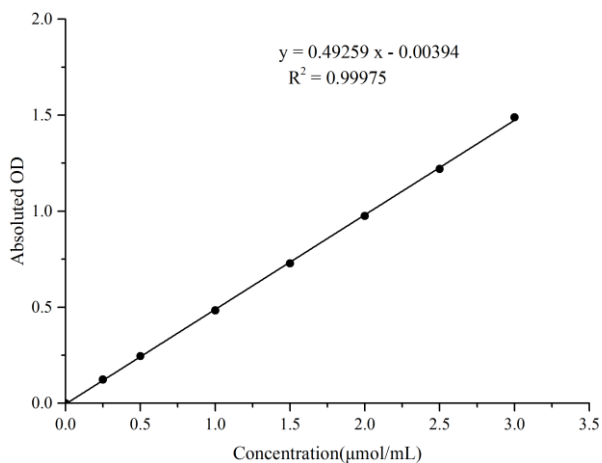
检测范围	0.42-4.99 $\mu\text{mol Pi/mL/hour}$	平均批间差	2.2 %
灵敏度	0.11 $\mu\text{mol Pi/mL/hour}$	平均批内差	2.2 %
平均回收率	104 %		

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)

①标准品浓度测定数据:

标准品浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ )	0	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
OD 值	0.037	0.161	0.283	0.522	0.766	1.021	1.259	1.535
	0.038	0.161	0.283	0.520	0.765	1.004	1.255	1.517
平均 OD 值	0.038	0.161	0.283	0.521	0.766	1.012	1.257	1.526
绝对 OD 值	0	0.123	0.245	0.483	0.728	0.974	1.219	1.488

②制标准曲线，如下图所示：





## 附录2 实例分析

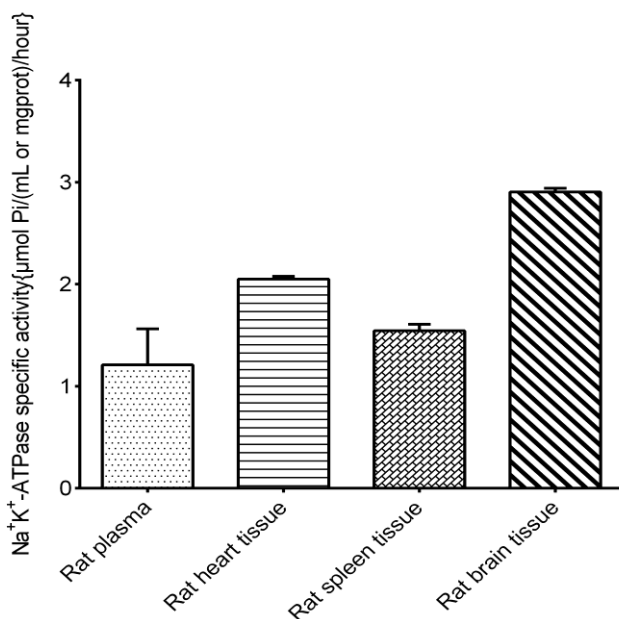
例如检测大鼠心脏(数据仅供参考):

取新鲜制备的10%大鼠心脏组织匀浆上清,用生理盐水稀释4倍后,按照说明书操作,结果如下:

磷的标准曲线:  $y = 0.4926x - 0.0039$ , 测定孔平均OD值为0.267, 对照孔平均OD值为0.165, 10%大鼠心脏组织匀浆蛋白浓度为6.23 mgprot/mL, 计算结果如下:

$$\begin{aligned} \text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP酶活力} &= (0.267 - 0.165 + 0.0039) \div 0.4926 \times 0.25 \div (6.23 \times 0.1) \div \frac{1}{6} \times 4 \\ (\mu\text{mol Pi/mgprot/hour}) & \\ &= 2.07 \mu\text{mol Pi/mgprot/hour} \end{aligned}$$

按照说明书操作,测定大鼠血浆(加样量0.1 mL)、大鼠心脏组织(10%组织匀浆蛋白浓度6.23 mgprot/mL, 稀释4倍, 加样量0.1 mL)、大鼠脾脏组织(10%组织匀浆蛋白浓度9.31 mgprot/mL, 稀释4倍, 加样量0.1 mL)、大鼠脑组织(10%组织匀浆蛋白浓度6.52 mgprot/mL, 稀释4倍, 加样量0.1 mL)(如下图):



### 附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
OD 值偏低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
OD 值异常偏高	显色剂工作液被污染	重新配制试剂验证
复孔差异大	未离心完全	取上清再次离心,使上清完全透亮无杂质
样本测不出值	样本稀释倍数太大,或者样本值低	减小稀释倍数、升高样本检测液制备过程中的组织浓度,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
11. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on

- monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022. IF:7.573
12. Liu P, Yin Z, Chen M, et al. Cytotoxicity of adducts formed between quercetin and methylglyoxal in PC-12 cells[J]. *Food Chemistry*, 2021, 352(2):129424. IF:7.514
  13. Adhikari B, Adhikari M, Ghimire B, et al. Cold plasma seed priming modulates growth, redox homeostasis and stress response by inducing reactive species in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 156: 57-69. IF:7.376
  14. Zhao X, Wang C, Dai S, et al. Quercetin Protects Ethanol-Induced Hepatocyte Pyroptosis via Scavenging Mitochondrial ROS and Promoting PGC-1  $\alpha$  -Regulated Mitochondrial Homeostasis in L02 Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:4591134. IF:7.31
  15. Chagas TQ, Freitas N, Montalvão MF, Nobrega RH, Machado MRF, Charlie-Silva I, Araújo APDC, Guimarães ATB, Alvarez TGDS, Malafaia G. Multiple endpoints of polylactic acid biomicroplastic toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Chemosphere*. 2021 Aug;277:130279. IF:7.086
  16. Mlindeli Gamede, Lindokuhle Mabuza, Phikelelani Ngubane, et al. Preventing the onset of diabetes-induced chronic kidney disease during prediabetes: The effects of oleanolic acid on selected markers of chronic kidney disease in a diet-induced prediabetic rat model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021 Jul;139:111570. IF:6.529
  17. Yang H, Zhu Y, Ye Y, et al. Nitric oxide protects against cochlear hair cell damage and noise-induced hearing loss through glucose metabolic reprogramming[J]. *Free radical biology & medicine*, 2021. IF:6.525
  18. Rao M J, Xu Y, Tang X, et al. CsCYT75B1, a Citrus CYTOCHROME P450 Gene, Is Involved in Accumulation of Antioxidant Flavonoids and Induces Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2020, 9(2):161. IF:6.313
  19. Liou G G, Hsieh C C, Lee Y J, et al. N-Acetyl Cysteine Overdose Inducing Hepatic Steatosis and Systemic Inflammation in Both Propacetamol-Induced Hepatotoxic and Normal Mice[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3):442. IF:6.312
  20. Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 236:113494-. IF:6.233