

H+K+-ATP 酶活力测试盒

(货号: BC125)

一、试剂组成与配制:

	组分	100 管/48T	200 管/96T	保存
试剂一	液体	10mL×2瓶	10mL×3瓶	4°C保存
试剂二	液体	7mL×1瓶	7mL×2瓶	4°C保存
试剂三	液体	8mL×1瓶	8mL×2瓶	4°C保存
试剂四	粉剂	粉剂×2支	粉剂×4支	-20°C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°C以下可保存1周。				
试剂五	粉剂	粉剂×2支	粉剂×4支	4°C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°C保存。				
试剂六	液体	3mL×1支	3mL×2支	4°C保存
试剂七	液体	10mL×1支	10mL×2支	4°C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°C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°C可保存一周。				
试剂九	粉剂	粉剂×1瓶	粉剂×2瓶	4°C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	2.5mol/L硫酸	100mL×1瓶	100mL×2瓶	室温保存
试剂十一	10mmol/L 磷标准贮备液	10mL×1瓶	10mL×1瓶	4°C保存
0.5µmol/mL磷标准的配制: 用时按10mmol/L磷标准贮备液: 双蒸水 = 1:19的比例配制, 如取0.5mL加双蒸水9.5mL。				
定磷剂的配制: 按双蒸水 : 2.5mol/L 硫酸 : 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。				

二、样本前处理

准确称取胃粘膜组织重量, 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, 再用生理盐水 5 倍稀释成 2% 的浓度待测。

三、规范操作步骤:

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°C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 400μL 上清作定磷反应。		

2、定磷反应:

管号	标准管	对照管	测定管
0.5μmol/mL 标准磷应用液 (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°C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。			

四、如果您的样品很多可以采用简便操作法:

1、测试前将对照管试剂及测定管试剂分别配成混合试剂 A 液和 B 液, 具体配法如下:

根据规范操作表中各管的试剂量乘以您所需要测试的样本数 (n) 再放 1~2 只管的量 (避免吸到最后试剂量不够) 然后纵向混合成 A 液 (对照管的加液) 及 B 液 (测定管的加液), 具体配制见下表:

管 号	对照管	测定管
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 (μL)	40× (n+2)	40× (n+2)
试剂五 (μL)	40× (n+2)	40× (n+2)
试剂六 (μL)		40× (n+2)
混合试剂总量 (μL)	330× (n+2)	330× (n+2)
每管应吸液量 (μL)	330	330

2、简化操作步骤:

①、酶促反应:

管 号	对照管	测定管
对照管液 (A 液) (μL)	330	
测定管液 (B 液) (μL)		330
样 本 (μL)		100

混匀, 37°C水浴准确反应 10 分钟

试剂七 (μL)	50	50
样 本 (μL)	100	
混匀, 离心 3500 转/分×10 分钟, 取上清 400μL 上清作定磷反应。		

②、定磷反应:

管 号	标准管	对照管	测定管
-----	-----	-----	-----

0.5μmol/mL 标准磷应用液 (μL)	400		
对照管上清液 (μL)		400	
测定管上清液 (μL)			400
定磷剂 (μL)	2000	2000	2000
混匀, 45°C水浴 5 分钟, 冷却至室温, 在 660nm, 1cm 光径, 双蒸水调零测各管吸光度值。			

五、计算公式及举例:

1、定义: 规定每小时每毫克组织蛋白的 ATP 酶分解 ATP 产生 1μmol 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(μmolPi/mgprot/hour)。

2、计算公式:

$$\text{H}^+\text{K}^+ - \text{ATPase 活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div \frac{T}{60} \div C_{\text{pr}}$$

C_{标准}: 标准品浓度, 0.5μmol/mL;

N: 反应体系中样本的稀释倍数, 4.8;

T: 反应时间, 10min;

C_{pr}: 样本蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

3、计算举例:

取 2%大鼠胃粘膜组织匀浆测 H⁺K⁺-ATP 酶, 测得各管吸光度值如下: 测定管 OD 值为 0.689, 对照管的 OD 值为 0.189, 标准管的 OD 值为 0.769, 2%大鼠胃粘膜组织匀浆的蛋白浓度为 1.159mgprot/mL, 则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{H}^+\text{K}^+ - \text{ATPase 活力 (U/mgprot)} &= \frac{0.689 - 0.189}{0.769} \times 0.5 \times 4.8 \div \frac{10}{60} \div 1.159 \\ &= 8.078\text{U/mgprot} \end{aligned}$$

六、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苷抑制的 ATP 酶。

七、注意事项:

- 1、具有微量、灵敏、快速的特点。所以对测定所用试管要求严格, 要没有一点磷, 若试管放过磷酸或磷酸缓冲液, 一定要洗得非常干净, 即先用洗洁精加水煮, 再用自来水冲, 最后用双蒸水冲干净。最好用一次性塑料管或新玻璃管, 避免磷污染是检测成败的关键。
- 2、定磷剂配好后, 不可放置太久, 一般保存 1~5 天, 最好现用现配。随时放冰箱。
- 3、最好采用先配 A、B 两种混合液, 然后按简化操作步骤检测。这样快捷、准确。
- 4、所有配试剂的器皿均要专用, 包括吸硫酸的吸管及盛水的器皿。

八、测定意义:

H⁺K⁺-ATPase 对胃酸的分泌及胃的消化功能具有重要的生理意义, 70 年代 Forte 等人首先在牛蛙的胃粘膜上分离出一类能被 K⁺ 专一激活而不被乌本苷抑制的 ATPase 即 H⁺K⁺-ATPase, 随后 Leej 等人又证明了含有该酶的膜囊泡运动跨膜运输质子的作用, 从而为胃酸分泌的机理奠定了分子学基础, H⁺K⁺-ATPase 定位于胃粘膜壁细胞 (Parietal



ELK Biotechnology

Tel: +86-027-59760950 Website: www.elkbiotech.cn

lell) 上, 属于第二类质子泵, 它通过自身的磷酸化 ($E_1 \rightarrow E_2$) 与去磷酸化 ($E_2 \rightarrow E_1$) 完成的 H^+/K^+ 电中性 (electroneutral) 跨膜离子转运, 不断将壁细胞内的质子运输到膜外行使泌酸的功能。