

CheKine™ Na⁺/K⁺-ATP 酶活性检测试剂盒（微量法）

货号：KTB1800

规格：48 T/24 S

96 T/48 S

批号：见产品标签

	适用样本：血清（浆）、动植物组织、细胞、细菌
	保质期：-20℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

Na⁺/K⁺-ATP 酶（Na⁺/K⁺-ATPase, EC 7.2.2.13）是一种广泛分布于机体内生物膜系统的酶，在细胞生理学中发挥多种功能，可催化 ATP 水解生成 ADP 和无机磷。

本试剂盒检测原理是样本中存在的 Na⁺/K⁺-ATPase 分解 ATP 生成 ADP 及无机磷，通过测定生成的无机磷的量可确定 Na⁺/K⁺-ATPase 活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	60 mL×2	4℃
Assay Buffer	5 mL	10 mL	4℃
Reagent I	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存
Reagent II	1 mL	2 mL	4℃
Reagent III	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存
Reagent IV	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存
Reagent V	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存
Reagent VI	25 mL	25 mL	4℃
Standard	5 mL	10 mL	4℃

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 660 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	PBS、去离子水	处理样本用/配制试剂、检测用
其他	匀浆器（组织样本）、恒温箱、冰盒、低温离心机、 可调式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有 助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 **2-3** 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 该试剂盒提取的样本也可以适用于 KTB1810 的测定。
- 配试剂最好用新的烧杯、玻璃棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿避免磷污染。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Assay Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Reagent I	临用前配制；加 7.2 mL 去离子水溶解	用不完的试剂-20℃避光分装保存 1 周， 避免反复冻融
Reagent II	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Reagent III	临用前配制；加 3 mL 去离子水溶解	用不完的试剂 4℃避光保存可稳定 2 周。有刺激性气味，建议在通风橱进行
Working Reagent IV	临用前配制；加 25 mL 去离子水溶解	用不完的试剂 4℃避光保存可稳定 2 周。
Working Reagent V	临用前配制；加 25 mL 去离子水溶解	用不完的试剂 4℃避光保存可稳定 2 周。有一定毒性建议在通风橱进行
Reagent VI	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存。有腐蚀性建议在通风橱进行
0.5 μmol/mL Standard	临用前配制；取 0.1 mL Standard 加 1.9 mL 去离子水混匀	4℃保存

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存1个月。处理好的样本须当天检测。

- 动植物组织：称取约0.1 g样本，加入1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆，8000 g，4℃离心10 min，取上清液，置冰上待测。
- 细胞或细菌样本：收集 5×10^6 个细胞或细菌，用冷的PBS清洗细胞或细菌，800 g离心2 min后弃上清（注意尽量去除管口及管壁残留液滴），加入1 mL Extraction Buffer，冰浴超声波破碎5 min（功率20%或200 W，超声3 s，间隔7 s，重复30次），然后8000 g，4℃离心10 min，取上清液，置冰上待测。
- 血清（浆）样本：直接测定。

05-3 实验步骤

1. 酶标仪准备：预热30 min以上，调节波长到660 nm。
2. 定磷剂的配制：临用前，按去离子水: Working Reagent IV: Working Reagent V: Reagent VI=2:1:1:1的比例配制，配好的定磷剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂现配现用。
3. 酶促反应：在1.5 mL EP管中按照如下方式操作，每个测定管需设置一个对照管。

试剂	对照管 (μL)	测定管 (μL)
Assay Buffer	65	45
Working Reagent I	60	60
Reagent II	0	20
样本	0	100
混匀，置于37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）水浴锅准确反应10 min		
Working Reagent III	25	25
样本	100	0
混匀，4000 g，常温离心10 min，取上清液		

4. 定磷：在96孔板中按照如下方式操作，空白孔和标准孔各做1个即可。

试剂	空白孔 (μL)	标准孔 (μL)	对照孔 (μL)	测定孔 (μL)
0.5 μmol/mL Standard	0	20	0	0
上清液	0	0	20	20
去离子水	20	0	0	0
定磷剂	200	200	200	200

5. 混匀，室温放置30 min。
6. 吸光度检测：测定660 nm处吸光值A，分别记为 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 和 $A_{\text{测定}}$ 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为了帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)进入“技术中心”查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。

2. 样本 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ 活力计算

● 按样本质量计算

单位的定义：规定每小时每克组织中 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ 分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase 活力(U/g)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div (T \div 60) = 7.5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

● 按细胞或细菌数量计算：

单位的定义：规定每小时每 1 万个细胞或细菌中 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ 分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase 活力(U/10}^4\text{)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) \div (T \div 60) = 7.5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N$$

● 按液体体积计算

单位的定义：规定每小时每毫升血清（浆）中 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ 分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase 活力(U/mL)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \div (T \div 60) = 7.5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$$

● 按蛋白浓度数量计算

单位的定义：规定每小时每毫克组织蛋白中 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ 分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase 活力(U/mg)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div (T \div 60) = 7.5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

$C_{\text{标准}}$ ：标准管浓度，0.5 $\mu\text{mol/mL}$ ； $V_{\text{总}}$ ：酶促反应总体积，0.25 mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.1 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入 Extraction Buffer 体积，1 mL； T ：反应时间，10 min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本鲜重，g； N ：细胞数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6 ， $N=500$ ）。

07 结果展示

示例-1：取小鼠血清，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.507 - 0.457 = 0.05$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.288 - 0.042 = 0.246$ 。按样本体积计算得： $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase 活力(U/mL)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \div (T \div 60) = 7.5 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 1.524 \text{ U/mL}$ 。

08 FAQ

● 检测得到的样本吸光值 $\Delta A_{\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办？

如果样本吸光值 $\Delta A_{\text{测定}} > 0.3$ ，需用 Extraction Buffer 适当稀释或减少提取用样本量，再重新进行测定。如果样本吸光值 $\Delta A_{\text{测定}} < 0.01$ ，可提高样本量。

09 相关产品

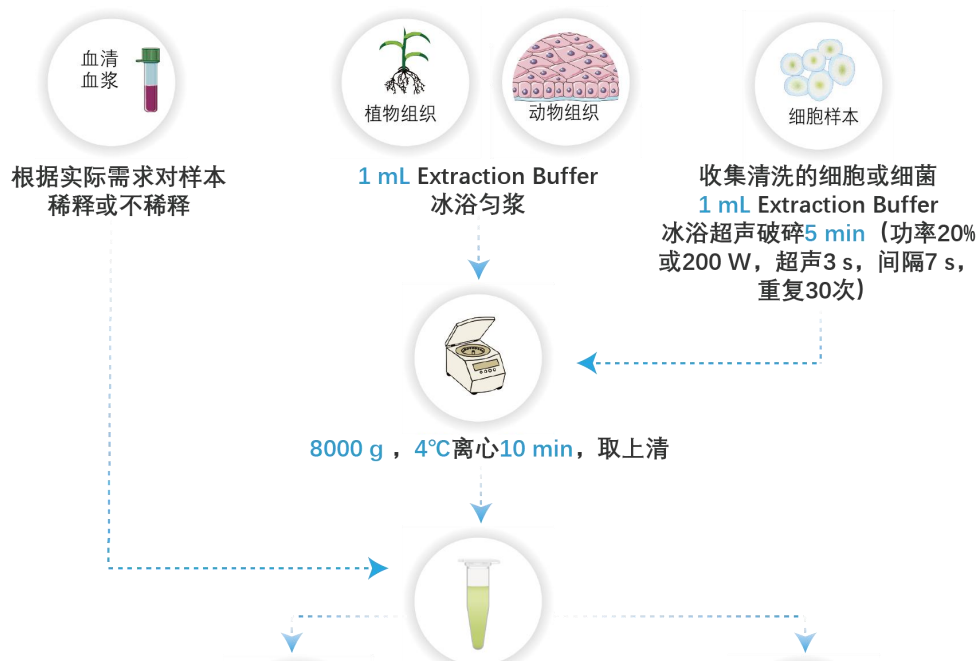
货号	试剂盒名称
KTB1810	CheKine™ Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -ATP 酶活性检测试剂盒（微量法）

临用前，按去离子水

CheKine™ Na⁺/K⁺-ATP酶活性检测流程示意图

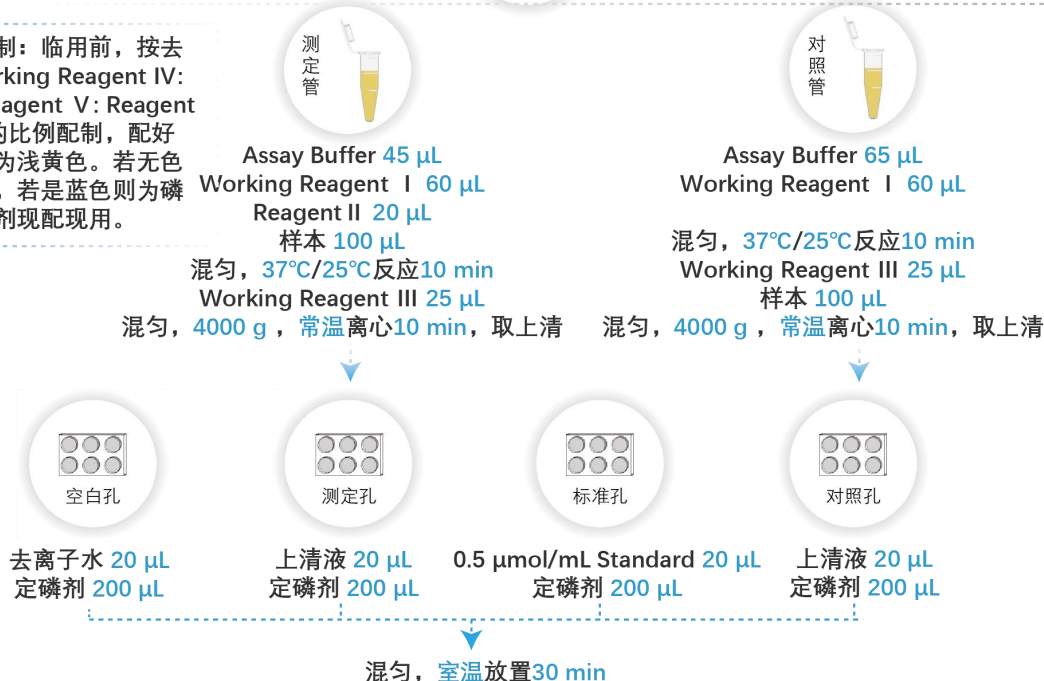
(Abbkin 货号：KTB1800)

样本处理



定磷剂的配制：临用前，按去离子水：Working Reagent IV：Working Reagent V：Reagent VI=2:1:1:1的比例配制，配好的定磷剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂现配现用。

体系配置



数据检测

测定660 nm 吸光度
结果计算