

(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-K212-M

产品规格: 48T(22 samples)/96T(46 samples)

检测仪器: 酶标仪(660 nm)

Elabscience® Ca²⁺-ATP 酶比色法测试盒

Ca²⁺-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各种动物组织样本中 Ca^{2+} -ATP 酶活力。

检测原理

ATP 酶可分解 ATP 生成无机磷,测定无机磷的量可判断 ATP 酶活力的高低。在对照体系中通过抑制 Ca^{2+} -ATP 酶酶活,测定体系不抑制 Ca^{2+} -ATP 酶酶活,测定与对照两者无机磷含量差值即为 Ca^{2+} -ATP 酶在孵育时间内产生的无机磷。通过无机磷产生判断 Ca^{2+} -ATP 酶的酶活。

本试剂盒检测组织样本时,需测定总蛋白浓度,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)(48T)	规格 2 (Size 2)(96T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	激活剂 A (Activator A)	1 mL×1 支	2 mL×1 支	2-8℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	激活剂 B (Activator B)	1 mL×1 支	2 mL×1 支	2-8℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 (Substrate)	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	蛋白沉淀剂 (Protein Precipitator)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	酸试剂 (Acid Reagent)	5 mL×1 瓶	10 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂九 (Reagent 9)	10 mmol/L 标准品溶液 (10 mmol/L Standard Solution)	2 mL×1 支	2 mL×1 支	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（660 nm）

试剂：超纯水、生理盐水(0.9% NaCl)。

试剂准备

① 检测前，将所有试剂平衡至室温。

② 试剂四工作液的配制：

每瓶试剂四用5 mL双蒸水混匀溶解，2-8℃保存7天。

③ 试剂六工作液的配制：

每瓶试剂六用5 mL双蒸水混匀溶解，2-8℃避光保存7天。

④ 试剂八工作液的配制：

每瓶试剂八加入5 mL双蒸水，90-100℃水浴溶解，室温冷却待用，2-8℃保存7天。

⑤ 定磷剂的配制：

按双蒸水：试剂六工作液：试剂七：试剂八工作液体积比=2：1：1：1进行配制，配制完成的定磷剂应为淡黄色，若为其他颜色，应排除磷污染因素后重新配制。配制后避光，按需配制，2-8℃避光保存5天

⑥ 0.5 mmol/L标准品溶液的配制：

取试剂九用双蒸水按体积比1：19进行稀释，按需配制，2-8℃保存7天。

样本准备

① 样本处理

组织样本：匀浆介质是生理盐水(0.9% NaCl)，匀浆离心后取上清进行测定，留取部分上清测蛋白。

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：1.18-286.43 U/kg wet weight，可参考下表进行稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肝组织	5-8	10%小鼠肝组织	不稀释
10%大鼠心脏组织	5-8	10%大鼠肺组织	5-8
10%大鼠肾组织	5-8	10%大鼠脑组织	2-3

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

① 配制定磷剂时，选用玻璃容器配制，玻璃容器使用前用双蒸水反复冲洗10遍。配制好的定磷剂应为淡黄色，如果是绿色或者蓝色，则表示配制过程中定磷剂被污染，需要重新配制。

② 操作步骤中，小心吸取EP管上清进行测定，请勿吸取到沉淀。

③ 实验时小心操作，防止外部磷污染。

操作步骤

孵育反应

- ① 非酶管：取 170 μL 试剂一加入至 1.5 mL 的 EP 管，
酶管：取 170 μL 试剂一加入至 1.5 mL 的 EP 管。
- ② 向步骤①中非酶管加入 40 μL 试剂二，
向步骤①中酶管中加入 40 μL 试剂三。
- ③ 向步骤②中各管加入 40 μL 试剂四工作液。
- ④ 向步骤③中酶管加入 200 μL 待测样本，涡旋混匀。
- ⑤ 非酶管与酶管放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 20 min。
- ⑥ 向步骤⑤中非酶管中加入 50 μL 试剂五，混匀后加入 200 μL 待测样本，向步骤⑤中酶管中加入 50 μL 试剂五。
- ⑦ 非酶管与酶管分别混匀，2000 $\times g$ 离心 10 min，取上清液待用。

显色反应

- ① 空白孔：取双蒸水 20 μL 加入对应酶标孔中
标准孔：取 0.5 mmol/L 标准品 20 μL 加入对应酶标孔中
对照孔：取非酶管上清液 20 μL 加入对应酶标孔中
测定孔：取酶管上清液 20 μL 加入对应酶标孔中
- ② 向步骤①各酶标孔中加入 200 μL 定磷剂。
- ③ 震板混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min，酶标仪 660 nm 处测定各孔的 OD 值。

操作表

孵育反应

	非酶管	酶管
试剂一(μL)	170	170
试剂二(μL)	40	
试剂三(μL)		40
试剂四工作液(μL)	40	40
待测样本(μL)		200
混匀, 37℃ 孵育 20 min。		
试剂五(μL)	50	50
待测样本(μL)	200	
混匀, 2000 \times g 离心 10 min, 取上清液待用。		

显色反应

	空白孔	标准孔	对照孔	测定孔
双蒸水(μL)	20			
0.5 mmol/L 标准品(μL)		20		
非酶管上清液(μL)			20	
酶管上清液(μL)				20
定磷剂(μL)	200	200	200	200
震板混匀, 37℃ 孵育 30 min, 酶标仪 660 nm 处测定各孔的 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 BCA 法(货号: E-BC-K318-M)。

结果计算

动物组织等样本中的钙 ATP 酶的酶活力(按组织蛋白计算):

定义: 在 37℃ 条件下, 每小时每克组织蛋白中的 ATP 酶分解 ATP 产生 1 mmol 无机磷的能力定义为一个酶活力单位。

$$\text{钙 ATP 酶活力 (U/gprot)} = \frac{A_2}{A_1} \times C \div t \times \frac{V_1}{V_2} \div C_{pr} \times f$$

动物组织等样本中的钙 ATP 酶活力(按组织湿重计算):

定义: 在 37℃ 条件下, 每小时每千克湿重组织中的 ATP 酶分解 ATP 产生 1 mmol 无机磷的能力定义为一个酶活力单位。

$$\text{钙 ATP 酶活力 (U/kg wet weight)} = \frac{A_2}{A_1} \times C \div t \times \frac{V_1}{V_2} \div \frac{m}{V_3} \times f$$

注解:

A₂: 测定孔 OD 值-对照孔 OD 值

A₁: 标准孔 OD 值-空白孔 OD 值

C: 标准品浓度(0.5 mmol/L)

t: 酶促反应时间(20 min=1/3 h)

V₁: 孵育反应总体积(0.5 mL)

V₂: 待测样本体积(0.2 mL)

V₃: 匀浆介质生理盐水体积(mL)

m: 组织称量重量(g)

C_{pr}: 组织蛋白浓度(gprot/L)

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

检测范围	1.18-286.43 U/kg wet weight	平均批间差	8.0 %
灵敏度	1.18 U/kg wet weight	平均批内差	6.0 %
平均回收率	107 %		

附录2 实例分析

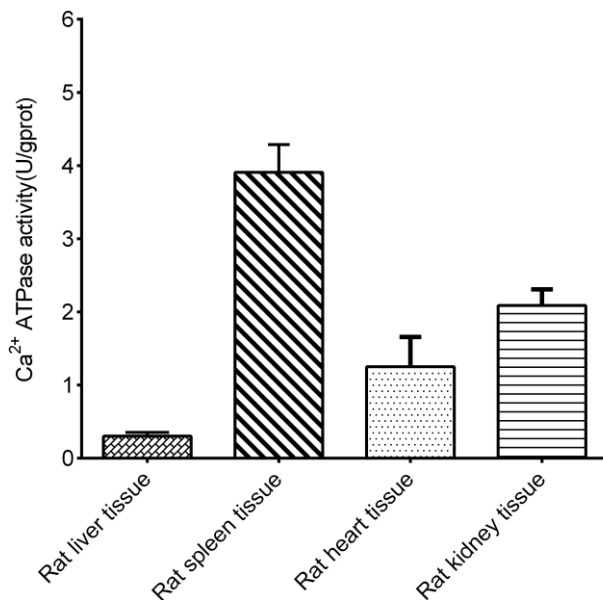
例如检测大鼠肝组织(数据仅供参考):

取10%大鼠肝组织匀浆, 稀释5倍。按说明书操作, 结果如下:

对照孔OD值: 0.199, 测定孔OD值: 0.215, 标准孔OD值: 0.296, 空白孔OD值: 0.051, 10%大鼠肝组织匀浆蛋白浓度: 8.96 gprot/L, 计算结果为:

$$\text{钙 ATP 酶活力} = (0.215 - 0.199) \div (0.296 - 0.051) \times 0.5 \times 3 \times (0.5 \div 0.2) \div 8.96 \times 5 = 0.13 \text{ U/gprot (U/gprot)}$$

按照操作过程, 测定大鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度为8.96 gprot/L, 稀释5倍, 加样量20 μL)、大鼠脾组织(10%组织匀浆蛋白浓度为5.80 gprot/L, 稀释5倍, 加样量20 μL)、大鼠心组织(10%组织匀浆蛋白浓度为4.46 gprot/L, 稀释5倍, 加样量20 μL)、大鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度为7.79 gprot/L, 稀释5倍, 加样量20 μL)中钙ATP酶活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
定磷剂变蓝	磷污染	清洗瓶子，重新配制定磷剂
显色反应颜色过深	样本稀释倍数过小	选择合适的稀释倍数，重新检测
复孔差较大	操作误差	按照说明书规范操作
不显色或显色不明显	样本含量低或样本不新鲜	采用新鲜组织样本

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 H₂O₂ 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 nanoplatfrom 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 α -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