

(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-S

产品规格: 50 Assays(23 samples)/100 Assays(48 samples)

检测仪器: 紫外-可见光分光光度计(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和细胞样本中 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) (50 Assays)	规格 2 (Size 2) (100 Assays)	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)	2 mL×1 支	2 mL×2 支	2-8℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	激活剂 B (Activator B)	2 mL×1 支	2 mL×2 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)	10 mL×1 瓶	10 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 Agent)	25 mL×1 瓶	50 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

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)、恒温箱

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10 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25 mL双蒸水溶解,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25 mL双蒸水,90-100℃水浴溶解,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,现配现用。

⑥ 0.5 μmol/mL标准品溶液的配制:

试剂九用双蒸水稀释20倍,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。

细胞样本：取 4×10^6 细胞加入 500 μL 生理盐水(0.9% NaCl)进行匀浆。匀浆后，4 $^{\circ}\text{C}$ ，10000 $\times g$ 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

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：0.8-41 U/g组织湿重，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 试剂一加入至非酶管，
酶管：取 170 μL 试剂一加入至酶管。
- 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 10 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 对照管：取非酶管上清液 200 μL 加入 5 mL EP 管；
测定管：取酶管上清液 200 μL 加入 5 mL EP 管；
标准管：取 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品 200 μL 加入 5 mL EP 管；
空白管：取双蒸水 200 μL 加入 5 mL EP 管。
- ② 向步骤①各管中加入 2 mL 定磷剂。
- ③ 混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min，用光径 1 cm 比色皿于紫外-可见光分光光度仪波长 660 nm 处检测，双蒸水调零，检测各管吸光度。

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 10 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

	标准管	空白管	对照管	测定管
0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品(μL)	200			
双蒸水(μL)		200		
非酶管上清液(μL)			200	
酶管上清液(μL)				200
定磷剂(μL)	2000	2000	2000	2000
混匀, 37℃ 孵育 30 min, 用光径 1 cm 比色皿于紫外-可见光分光光度计波长 660 nm 处检测, 双蒸水调零, 检测各管吸光度。				

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

动物组织等样本和细胞样本中的 Ca²⁺-ATP 酶的酶活力(按蛋白计算):

定义: 在 37℃ 条件下, 每小时每毫克组织和细胞蛋白中的 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的能力定义为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{2+}\text{-ATP 酶活力} = \frac{A_2}{A_1} \times C \div t \times \frac{V_1}{V_2} \div C_{pr} \times f$$

(U/mgprot)

动物组织等样本中的 Ca²⁺-ATP 酶的酶活力(按组织湿重计算):

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

$$\text{Ca}^{2+}\text{-ATP 酶活力} = \frac{A_2}{A_1} \times C \div t \times \frac{V_1}{V_2} \div \frac{m}{V_3} \times f$$

(U/g 组织湿重)

细胞样本中的 Ca²⁺-ATP 酶的酶活力(按细胞数量计算):

定义: 在 37℃ 条件下, 每小时每 10⁶ 细胞中的 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的能力定义为一个酶活力单位。

$$\text{Ca}^{2+}\text{-ATP 酶活力} = \frac{A_2}{A_1} \times C \div t \times \frac{V_1}{V_2} \div \frac{N}{V_3} \times f$$

(U/10⁶)

注解:

A₂: 测定管 OD 值-对照管 OD 值

A₁: 标准管 OD 值-空白管 OD 值

C: 标准品浓度(0.5 μmol/mL)

t: 酶促反应时间(10 min=1/6 h)

V₁: 孵育反应总体积(500 μL)

V₂: 待测样本体积(200 μL)

N: 当加入细胞为 4×10⁶ 个时, N=4

m: 组织称量重量(g)

V₃: 样本处理时加入匀浆介质的体积(mL)

C_{pr}: 样本的蛋白浓度(mgprot/mL)

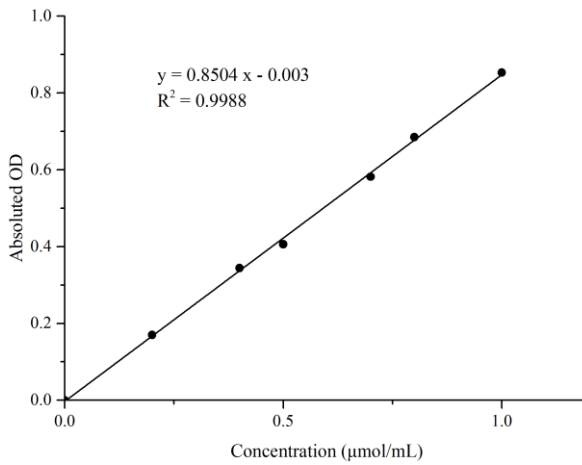
f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.8-41 U/g 组织湿重	平均批间差	8.8 %
灵敏度	0.8 U/g 组织湿重	平均批内差	4.1 %

2. 标准曲线(数据仅供参考)



附录2 实例分析

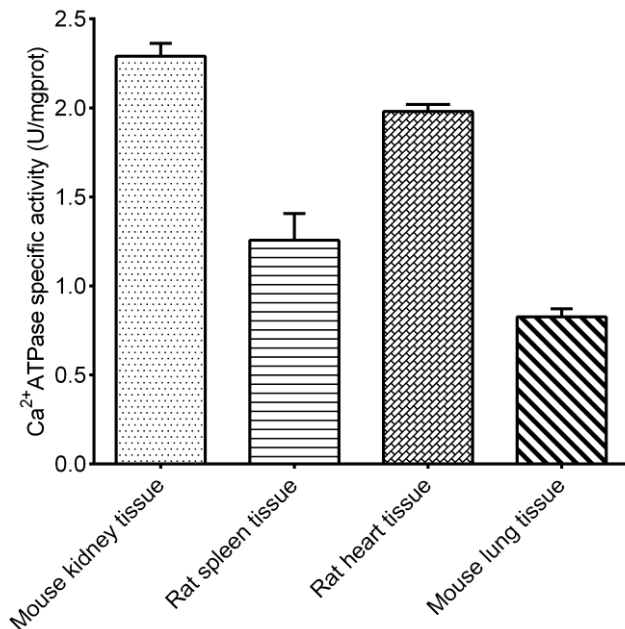
例如检测小鼠肾脏组织(数据仅供参考):

取10%小鼠肾组织匀浆, 稀释5倍, 按说明书操作, 结果如下:

对照管OD值: 0.152, 测定管OD值: 0.323, 标准管OD值: 0.405, 空白管OD值: 0.001, 10%小鼠肾组织匀浆蛋白浓度: 6.69 mgport/mL, 计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{Ca}^{2+}\text{ATP酶活力} &= (0.323 - 0.152) \div (0.405 - 0.001) \times 0.5 \times 6 \times (500 \div 200) \times 5 \div 6.69 \\ & \quad (\text{U/mgprot}) \\ &= 2.37 \text{ U/mgprot} \end{aligned}$$

按照操作过程, 测定小鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度为6.69 mgport/mL, 加样量200 μL)、大鼠脾组织(10%组织匀浆蛋白浓度为5.39 mgport/mL, 稀释5倍, 加样量200 μL)、大鼠心组织(10%组织匀浆蛋白浓度为6.68 mgport/mL, 稀释5倍, 加样量200 μL)、小鼠肺组织(10%组织匀浆蛋白浓度为3.90 mgport/mL, 稀释5倍, 加样量200 μL)中 Ca^{2+} -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
	匀浆介质为磷酸盐缓冲液	更换匀浆介质为生理盐水

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 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 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