

## 钙调神经磷酸酶 (CaN) 测试盒说明书(精简版)

(货号: A068-1-1 50 管/24 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

## 一、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 3 个月)

试剂组成		试剂装量	保存条件
试剂一	缓冲液	3mL×1 支	4℃
试剂二	粉剂	粉剂×1 支	4℃
	稀释液	1.5mL×1 支	4℃
	试剂二应用液配制: 取 R2 粉剂加入到 R2 稀释液中, 溶解完全后待用, 4℃保存 3 个月		
试剂三	贮备液	0.015mL×1 支	-20℃
	稀释液	0.15mL×1 支	4℃保存
	试剂三应用液配制: 按试剂三贮备液: 试剂三稀释液=1:10 的比例配制, 现用现配, 用多少配多少, 余下继续 -20℃以下保存 3 天。		
试剂四	终止剂	0.6 mL×1 支	4℃
试剂五	甲液	7mL×2 瓶	4℃避光
	乙液	6mL×2 瓶	4℃避光
显色剂配制: 用时取一瓶试剂五甲液加入一瓶试剂五乙液(乙液低温时可能会有絮状物产生, 需要 60℃水浴加热 10min 溶解后再使用)中, 充分混匀, 需提前 0.5 小时配制, 4℃保存至少可保存 5 天; 如您的样本量很少, 可按试剂五甲液: 试剂五乙液=7: 6 的比例进行配制, 需多少配多少(按比例配制显色剂时要防止磷污染, 最好用新的一次性吸嘴或是专用吸嘴)			
试剂六	稳定剂	30mL×1 瓶	4℃
试剂七	10mmol/L 标准磷贮备液	1mL×1 瓶	4℃
0.1mmol/L 标准磷应用液配制: 用时将试剂七标准磷贮备液 100 倍稀释, 即取 0.1mL 标准磷贮备液加双蒸水至 10mL, 现用现配。			

## 二、所需仪器耗材及试剂:

含 636nm 波长的分光光度计及 0.5cm 光径比色皿(或酶标仪及 96 孔板)、37℃水浴锅或恒温箱、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水(0.9%)、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂(组织及细胞样本用, 本公司有售)。

## 三、操作步骤:

## 1、酶促反应

	对照管	测定管
试剂一缓冲液(μL)	60	60
试剂二底物液(μL)	25	25
试剂三应用液(μL)	3	3
待测样本(μL)		25
混匀, 37℃水浴 20min		
试剂四终止剂(μL)	12	12
样本(μL)		25
混匀, 离心 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清 50μL 定磷。		

## 2、定磷反应:

	空白管	标准管	测定管	对照管
双蒸水(μL)	50			
0.1mmol/L 标准磷应用液(μL)		50		
测定管上清(μL)			50	
对照管上清(μL)				50
试剂五显色剂(μL)	500	500	500	500
混匀, 静置 2 分钟				

试剂六稳定剂(μL)	500	500	500	500
混匀, 室温静置 5 分钟, 636nm 处, 0.5cm 光径, 双蒸水调零测各管吸光度 OD 值。				

- [注]:
- 1、标准管及标准空白管只需做 1-2 只。
  - 2、在比色前, 将比色皿用自来水冲洗 10 余次, 再用双蒸水冲洗 4~5 次, 以免磷污染。
  - 3、操作过程中的提到的混匀, 最好用漩涡混匀器充分混匀; 如果使用 EP 管操作, 最好用圆底或平底的。如果用尖底的 EP 管, 可以适当延长混匀时间, 混匀要充分。

## 四、计算:

- 1、定义: 规定每小时每毫克蛋白的钙调神经磷酸酶(CaN)分解底物 PNPP 产生 1μmol 无机磷的量为一个 CaN 的活力单位。

## 2、计算公式:

$$\text{CaN 活力} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \times \frac{60}{T} \div \text{Cpr}$$

(U/mgprot)

$C_{\text{标准}}$ : 标准液浓度, 0.1mmol/L (μmol/mL);

$N$ : 反应体系稀释倍数, 5 (125μL/25μL);

$T$ : 酶促反应时间, 20min;

$Cpr$ : 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 值蛋白)。

## 五、注意点:

- 1、具有微量、灵敏、快速的特点。最好用一次性试验用塑料管或 1.5mLEP 管操作(本所有售), 避免磷污染是检测成败的关键。
- 2、所有配试剂的器皿均要专用防止磷污染。
- 3、操作过程中的提到的混匀, 一定要用漩涡混匀器充分混匀; 如果使用 EP 管操作, 最好用圆底或平底的。如果用尖底的 EP 管, 可以适当延长混匀时间, 混匀更要充分。
- 4、测定本试剂盒的同时, 要测定组织匀浆中的蛋白浓度, 可以用本所的 A045-2 总蛋白试剂盒(考马斯亮蓝法)或 A045-3 总蛋白试剂盒(BCA 法)。