

钙调神经磷酸酶（CaN）测试盒

比色法:50 管/24 样

一、试剂组成与配制：

试剂组成		试剂装量	保存条件
试剂一	缓冲液	3ml×1 支	4℃保存 6 个月
试剂二	粉剂	粉剂×1 支	4℃保存 6 个月
	稀释液	1.5ml×1 支	4℃保存 12 个月
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℃以下保存 3 个月
	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，现配，用多少配多少， 余下继续-20℃以下可保存 3 天。			
试剂四	终止剂	0.6 ml×1 支	4℃保存 6 个月
试剂五	甲液	7ml×2 瓶	4℃避光保存 6 个月
	乙液	6ml×2 瓶	4℃避光保存 6 个月
显色剂配制：用时取一瓶试剂五甲液加入一瓶已预温好的试剂五乙液中，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℃保存 6 个月
试剂七	10mmol/L 标准品贮 备液	1ml×1 瓶	4℃保存 6 个月
0.1mmol/L 标准应用液配制：用时将试剂七标准磷贮备液 100 倍稀释，现用现配。			

二、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 50 μl 定磷。		

2、定磷:

	空白管	标准管	测定管	对照管
双蒸水 (μl)	50			

0.1mmol/L 标准应用液 (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。				

三、计算及举例:

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 $1 \mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 CaN 的活力单位。

2、计算公式:

$$CaN \text{ 活力} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白}} \times \text{标准品浓度} \times \text{反应体系稀释} \times 3 \times \text{待测样本蛋白浓度}$$

$$(U/mgprot) = OD \text{ 值} \times (0.1 \mu\text{mol/ml}) \div (\text{mgprot/ml})$$

[注]:

- 1、* 5 为样本在酶促反应体系中的稀释倍数，反应液总量为 250 μl，样本量为 50 μl；
- 2、** 单位定义为每小时，操作过程中的反应时间为 20 分钟，所以乘以 3；
- 3、U/mgprot= μ mol Pi/mgprot/hour
- 4、蛋白浓度可通过用本所的 A045-2-1 总蛋白定量考马斯亮蓝法试剂盒测定