

钙离子膜通道钙泵 SERCA (P 型 ATP 酶/内质网) 功能荧光检测试剂盒 产品说明书

主要用途

钙离子膜通道钙泵 SERCA (P 型 ATP 酶/内质网) 功能荧光检测试剂是一种旨在使用选择性内质网型钠钙交换体和线粒体钙泵抑制剂的条件下, 通过钙离子荧光探针, 探测在 ATP 的激发下, 进入内质网内的钙离子, 而产生荧光增强, 来分析和观察内质网钙泵转运功能的权威而经典的技术方法。该技术经过精心研制、成功实验证明的。其适用于各种动物、人体、真菌/酵母、植物等内质网 SERCA 活性的检测, 以及抑制剂筛选。产品严格无菌, 即到即用, 操作简捷, 性能稳定。

技术背景

钙 ATP 酶 (Ca^{++} -ATPase; EC3.6.3.8), 是五类 ATP 酶 (F、V、A、P 和 E 型) 中 P 型 ATP 酶 (P type ATPase) 之一。钙 ATP 酶又分成膜型 (plasma membrane type; PMCA)、肌质网或内质网型 (sarco/endoplasmic reticulum type; SERCA)、酵母高尔基型 (yeast-Golgi type; PMR1) 等。肌质网或内质网型钙 ATP 酶, 又称为内质网钙泵, 是一种膜上转运蛋白, 将钙离子由胞浆转运到内质网钙池储存, 调节胞内钙离子水平。Mag-Fluo--AM 染料是一种钙离子低亲和性的荧光标记染料, 特异性地由内质网捕获, 可以检测内质网内的游离钙离子浓度的变化, 进而分析内质网钙泵的作用模式, 监测镁 ATP 诱导的钙离子摄入, 来评价钙泵的功能。其基本检测步骤是, 首先引入荧光探针到内质网, 其次膜通透处理后, 同步加入线粒体钙泵抑制剂 FCCP、钠钙交换体 (NCX) 抑制剂 benzamil 和 Mg-ATP, 在荧光分光光度仪下 (激发波长 490nm, 散发波长 525nm) 观察荧光峰值的变化。

产品内容

清理液 (Reagent A)	100 毫升
染色液 A (Reagent B1)	10 毫升
染色液 B (Reagent B2)	100 微升
通透液 (Reagent C)	200 微升
钙化液 (Reagent D)	20 毫升
摄钙液 (Reagent E)	100 微升
诱导液 (Reagent F)	200 微升
产品说明书	1 份

保存方式

保存清理液 (Reagent A) 在 4℃ 冰箱里, 其余的保存在 -20℃ 冰箱里, 避免反复冻融; 染色液 B (Reagent B2) 避免光照; 有效保证 6 月

用户自备

胰蛋白酶乙二胺四乙酸混合液 (HL12024): 用于细胞脱离

完全细胞培养液 (HL12052): 用于细胞处理所需的培养基

15 毫升锥形离心管: 用于样品操作的容器

1.5 毫升离心管: 用于样品操作的容器

微型台式离心机: 用于样品操作

恒温水槽或培养箱: 用于反应孵育

100 微升比色皿或黑色 96 孔板: 用于荧光分析的容器

荧光分光光度仪或荧光酶标仪: 用于荧光定量分析

实验步骤

一、测定准备

1. 开启并设定好荧光分光光度仪或荧光酶标仪 (温度为 22℃): 激发波长为 490nm, 散发波长 525nm, 间隔 30 秒测读 1 次, 或动态测读, 并置零
2. 实验开始前, 将 -20℃ 冰箱里的试剂盒中的试剂置于室温下冻融预热, 避免光照。然后进行下列操作

二、荧光测定

(一) 间接法

1. 准备 1 个 25cm² 细胞培养瓶的待测细胞, 铺满率达 70% (1 X 10⁶ 细胞数)
2. 小心抽去细胞培养液
3. 加入 3 毫升 **清理液 (Reagent A)**, 覆盖细胞表面
4. 小心抽去**清理液 (Reagent A)**
5. 加入 1 毫升用户自备的胰蛋白酶乙二胺四乙酸混合液, 铺满细胞表面
6. 放进 37℃ 培养箱孵育 1 分钟
7. 轻轻抖动培养瓶, 使细胞脱落
8. 加入 3 毫升用户自备的完全细胞培养液
9. 移入到 15 毫升锥形离心管
10. 放进台式离心机离心 5 分钟, 速度为 600g (注意: 悬浮细胞可以从这一步开始操作)
11. 小心抽去上清液
12. 加入 500 微升**染色液 A (Reagent B1)**, 混匀细胞颗粒群
13. 加入 5 微升**染色液 B (Reagent B2)**, 混匀
14. 室温下孵育 60 分钟, 避免光照
15. 放进台式离心机离心 5 分钟, 速度为 600g
16. 小心抽去上清液
17. 加入 1 毫升**清理液 (Reagent A)**, 混匀细胞颗粒群
18. 转移到 1.5 毫升离心管
19. 加入 10 微升**通透液 (Reagent C)**
20. 放进 37℃ 培养箱, 孵育 4 分钟 (注意: 这一步骤决定最大内质网钙池浓度读数; 必要时可以调整孵育时间, 既不能过长, 导致细胞死亡, 又不能过短, 导致通透不足)
21. 放进微型台式离心机离心 5 分钟, 速度为 600g
22. 小心抽去上清液
23. 加入 1 毫升**钙化液 (Reagent D)**, 混匀细胞颗粒群

24. 室温下孵育 5 分钟
25. 放进微型台式离心机离心 5 分钟，速度为 600g
26. 小心抽去上清液
27. 加入 500 微升**清理液 (Reagent A)**，混匀细胞颗粒群
28. 分别移取 100 微升到 5 个 100 微升比色皿或黑色 96 孔板的 4 个孔，标记为背景、诱导钙摄入、完全钙摄入、待测抑制剂
29. 按下表分别加入

	背景	诱导钙摄入	完全钙摄入	待测抑制剂
清理液 (Reagent A)	5 微升	—	—	—
摄钙液 (Reagent E)	—	—	5 微升	—
即刻放进荧光分光光度仪或荧光酶标仪，动态测读 2 分钟，然后取出比色皿或黑色 96 孔板，分别加入下列试剂				
用户自备的待测抑制剂	—	—	—	5 微升
诱导液 (Reagent F)	—	5 微升	—	5 微升
意义	基础读数	Mg-ATP 依赖性诱导摄入读数	最大内质网钙池浓度读数	SERCA 抑制剂摄入读数

30. 即刻放进荧光分光光度仪或荧光酶标仪，动态测读 3 分钟
31. 获得相对荧光读数 (Relative Fluorescence Unit; RFU)
32. 分析结果
 - 1) (诱导钙摄入 RFU—背景 RFU): 荧光差值越高，表明 SERCA 转运功能活性越强
 - 2) **【(诱导钙摄入 RFU—背景 RFU) ÷ (完全钙摄入 RFU—背景 RFU)】 X 100%=诱导钙摄入百分率: 百分率越高，表明 SERCA 转运功能活性越强**
 - 3) 构建转运曲线: 纵座标 (Y) 为钙摄入相对荧光单位 (RFU)，横座标 (X) 为时间 (秒) (注意: 参见注意事项 8)
 - 4) 构建抑制曲线: 纵座标 (Y) 为荧光差值 RFU，横座标 (X) 为抑制剂浓度 (微摩尔)
 - 5) 根据上述曲线，计算 IC₅₀ (50%抑制率所需的抑制剂浓度)

二、直接法

1. 准备 1 个黑色 96 孔细胞培养板中 4 个孔的待测细胞，铺满率达 70% (5 X 10⁴ 细胞数/孔)，分别标记为背景、诱导钙摄入、完全钙摄入、待测抑制剂
2. 小心抽去细胞培养液
3. 小心加入 200 微升 **清理液 (Reagent A)**
4. 小心抽去**清理液 (Reagent A)**
5. 小心加入 100 微升**染色液 A (Reagent B1)**
6. 小心加入 1 微升**染色液 B (Reagent B2)**
7. 室温下孵育 60 分钟，避免光照
8. 小心抽去染色液
9. 加入 200 微升**清理液 (Reagent A)**

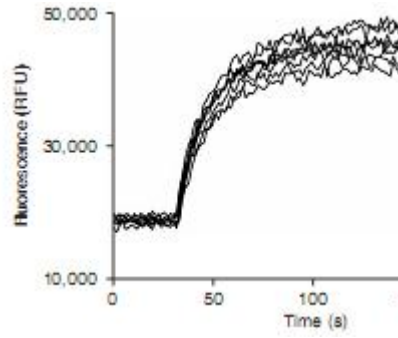
10. 加入 2 微升**通透液 (Reagent C)**
11. 放进 37℃培养箱，孵育 4 分钟（注意：这一步骤决定最大内质网钙池浓度读数；必要时可以调整孵育时间，既不能过长，导致细胞死亡，又不能过短，导致通透不足）
12. 小心抽去通透液
13. 加入 100 微升**钙化液 (Reagent D)**
14. 室温下孵育 5 分钟
15. 小心抽去钙化液
16. 加入 200 微升**清理液 (Reagent A)**
17. 按下表分别加入

	背景	诱导钙摄入	完全钙摄入	待测抑制剂
清理液 (Reagent A)	5 微升	——	——	——
摄钙液 (Reagent E)	——	——	5 微升	——
即刻放进荧光酶标仪，动态测读 2 分钟，然后取出黑色 96 孔板，分别加入下列试剂				
用户自备的待测抑制剂	——	——	——	5 微升
诱导液 (Reagent F)	——	5 微升	——	5 微升
意义	基础读数	Mg-ATP 依赖性诱导摄入读数	最大内质网钙池浓度读数	SERCA 抑制剂摄入读数

18. 即刻放进荧光酶标仪，动态测读 3 分钟
19. 获得相对荧光读数 (Relative Fluorescence Unit; RFU)
20. 分析结果
 - 1) (诱导钙摄入 RFU—背景 RFU): 荧光差值越高, 表明 SERCA 转运功能活性越强
 - 2) **【(诱导钙摄入 RFU—背景 RFU) ÷ (完全钙摄入 RFU—背景 RFU)】 X 100%=诱导钙摄入百分率: 百分率越高, 表明 SERCA 转运功能活性越强**
 - 3) 构建转运曲线: 纵坐标 (Y) 为钙摄入相对荧光单位 (RFU), 横坐标 (X) 为时间 (秒) (注意: 参见注意事项 8)
 - 4) 构建抑制曲线: 纵坐标 (Y) 为荧光差值 RFU, 横坐标 (X) 为抑制剂浓度 (微摩尔)
 - 5) 根据上述曲线, 计算 IC50 (50%抑制率所需的抑制剂浓度)

注意事项

1. 本产品为 20 次操作
2. 操作时, 须戴手套
3. 孵育时, 避免光照
4. 直接法, 细胞换液时, 避免使细胞脱落; 如果细胞贴壁较松, 建议使用间接法
5. 可以进行动态或定时荧光检测分析
6. 用户进行抑制剂筛选, 建议使用浓度梯度
7. 可以使用 SERCA 抑制剂毒胡萝卜素 (thapsigargin; TG) 作为抑制剂对照
8. 钙离子转运曲线参考图像如下:



| 基础 | 钙摄入曲线 |

9. 本公司提供系列钙离子膜通道转运功能 (transport/uptake) 分析试剂产品

质量标准

1. 本产品经鉴定性能稳定
2. 本产品经鉴定荧光清晰