

酸性磷酸酶(ACP)检测试剂盒(PNP 微板法)

产品编号: MA1532

规格: 120T

产品组成和保存/运输条件

产品组成	MA1532-1 120T	保存条件	有效期	运输条件
ACP Assay Buffer	30mL	2-8℃	自生产之日起 12 个月	湿冰运输
pNPP	2 支	-20℃, 避光		
p-nitrophenol(10mM)	0.5mL	-20℃, 避光		
Stopping Solution	20mL	RT		
说明书	1 份			

产品简介

酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ACP) 分布广泛, 存在于多种机体组织, 主要定位于细胞溶酶体, 因此常被用作溶酶体的标志酶; 溶酶体外的 ACP 则分布于内质网与细胞质。不同动物来源的酸性磷酸酶存在差异, 酶促反应最适 pH 为 4.5-5.5。ACP 属于多成员蛋白家族, 哺乳动物 ACP 分子量范围为 18 kD-100 kD, 可分为酒石酸盐敏感型与氟离子敏感型: 溶酶体 ACP 为酒石酸盐敏感型, 红细胞和巨噬细胞来源的 ACP 属于氟离子敏感型。

酸性磷酸酶(ACP)检测试剂盒(PNP 微板法), 即 Acid Phosphatase(S-ACP) Assay Kit, 检测原理为: 酸性环境中, 显色底物对硝基苯磷酸 (p-nitrophenyl phosphate, pNPP) 可在 ACP 催化下水解生成对硝基酚 (p-nitrophenol, p-NP); 产物 p-NP 于碱性条件下显黄色, 颜色深浅与 ACP 活性正相关, 在 405 nm 波长处存在特征吸收峰。通过测定产物生成量, 即可计算样品中 ACP 活性。本试剂盒适用于细胞 / 组织裂解液、组织匀浆液、血浆、血清、尿液等样本中酸性磷酸酶活性的检测。

自备材料

1. PBS 或生理盐水
2. 离心机、离心管、水浴锅或恒温箱、96 孔板、酶标仪

使用方法(仅供参考)

1. 准备样品:

① 血浆、血清和尿液样品: 血浆、血清按照常规方法制备后可直接用于测定, 尿液通常也可以直接用于测定, 来不及检测可 -80℃ 冻存, 但不宜反复冻融。

② 组织样品: 按照组织样本质量(g):生理盐水体积(mL)=1:10 匀浆, 离心后取上清待测, 留取部分上清进行 BCA 蛋白浓度测定。

③ 细胞样品: 按细胞数量(10^6):生理盐水体积(mL)=5:1 匀浆, 离心后取上清待测, 留取部分上清进行 BCA 蛋白浓度测定。

④ 样本的稀释: 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(5.0-300U/L), 使用 PBS 或生理盐水稀释后再行检测。

2. 配制显色工作液: 取出 1 支 pNPP, 恢复至室温后用 0.25mL 去离子水溶解, 置于冰上待用, 未用完部分 -20℃ 避光保存 2 天; 按 1: 20 的比例加入 ACP Assay Buffer, 混匀即成, 置于冰上避光待用, 新配制的显色工作液 6h 内有效。

3. 配制标准品工作液: 取出 p-nitrophenol(10mM)恢复至室温, 按 p-nitrophenol(10mM): ACP Assay Buffer=1: 19 的比例混合, 使浓度达到 0.5mM, 按下表继续稀释:



加入物(μL)	1	2	3	4	5	6
p-nitrophenol(0.5mM)	2	4	8	12	16	20
ACP Assay Buffer	18	16	12	8	4	0
标准品浓度(mM)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5

4. ACP 加样：按照下表设置空白孔、标准孔、测定孔和对照孔，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡；如果样品中的 ACP 活性过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置平行孔。

加入物(μL)	空白孔	标准孔	测定孔	对照孔
ACP Assay Buffer	20	—	—	40
标准品工作液(1-6 号)	—	20	—	—
待测样品	—	—	20	20
显色工作液	40	40	40	—

5. ACP 测定：轻轻混匀，37℃ 孵育 10min，每孔加入 160μL Stopping Solution 终止反应；酶标仪测定 405nm 处各管的吸光度。

6. 计算：以标准品工作液(1~6 号)浓度 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mM 为横坐标，以对应的标准孔吸光度为纵坐标，绘制标准曲线 $y=ax+b$ ，根据测定孔的吸光度在标准曲线上查得待测样品对硝基酚的生成量 $x=(\Delta A_{405}-b)\div a$ ，单位为 mM。

组织和细胞样本酸性磷酸酶活性单位的定义：在 pH 4.8、37℃ 条件下，每克组织或细胞蛋白每分钟催化底物生成 1μmol 对硝基酚所需要的 ACP 的酶量为一个活力单位。公式如下：

$$\text{ACP 活力(U/gprot)}=x\times 1000\times N\div t\times C_{pr}$$

血清(浆)和尿液样本酸性磷酸酶活性单位的定义：在 pH 4.8、37℃ 条件下，每升血清(浆)或尿液每分钟催化底物生成 1μmol 对硝基酚所需要的 ACP 的酶量为一个活力单位。公式如下：

$$\text{ACP 活力(U/L)}=x\times 1000\times N\div t$$

a---标曲斜率

N---样本加入反应体系前的稀释倍数

C_{pr}---样品蛋白浓度，gprot/L

ΔA₄₀₅---样本绝对 OD 值(测定 OD 值-对照 OD 值)

b---标曲截距

1000---单位换算，1mmol/L=1000μmol/L

t---酶促反应时间，min

y---标准品 OD 值-空白管 OD 值

注意事项

- 待测样品中不能含有磷酸酶抑制剂，同时需避免反复冻融。
- 如果待测样品体积较少，可减少样品加样量，以 ACP Assay Buffer 补至 0.1ml。
- 如果无法检测 405nm，亦可检测 400~415nm 范围内吸光度。
- 建议每次测定时都做标准曲线，以使标准更准确，另外标准品避免反复冻融。
- 待测样品中酸性磷酸酶活性较低时，可适当延长孵育时间至 30min。
- 检测组织和细胞样品时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 蛋白定量试剂盒。
- 配制 1 支显色工作液后应当日用完，因此请注意适当多准备一些样品一起检测。
- p-nitrophenol 溶液对人体有害，Stopping Solution 有腐蚀性，请小心操作。
- 如果希望进行酶活性的绝对定量，进行酶反应时应精确计时，此时推荐采用孵育 30min 或更长时间，以减小操作过程中的时间误差。
- 所有试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 本产品仅限科研实验使用，禁止用于临床、食品、化妆品等非科研场景。

S260801

