

酸性磷酸酶（Acid Phosphatase, ACP）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0903W48 微板法 48 样）

一、产品简介：

磷酸酶是一种重要的水解酶。酸性磷酸酶（ACP, EC 3.1.3.2）在酸性条件下磷酸酯去磷酸化。本试剂盒提供一种高灵敏度，简单，直接的检测方法，使用磷酸对硝基苯酯(pNPP)作为底物，生成黄色的产物PNP，该产物在405nm处有最大吸收峰。通过检测PNP在405nm下的增加速率，即可得到酸性磷酸酶（ACP）活性的大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×2 支	4°C保存	每支使用前甩几下使粉体落入底部，再加0.6mL 试剂一混匀，现配现用，一周内用完。
试剂三	液体 1.5mL×1 支	4°C保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、蒸馏水。

四、酸性磷酸酶（ACP）活性测定：

建议正式实验前选取2个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

1、样本制备：

- ① 组织样本：取约0.1g组织（水分充足的样本可取0.5g），加入1mL提取液，进行冰浴匀浆，4°C×12000rpm离心15min，取上清液待测。

【注】：①若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例提取

- ② 样本制备，当天准备当天测定。且样本中应避免酒石酸盐，氟化物，EDTA，草酸盐和柠檬酸盐等物质，因其对酸性磷酸酶的活性有抑制作用。

- ② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约500万细菌或细胞加入1mL提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率200W，超声3s，间隔10s，重复30次）；12000rpm 4°C离心10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为500~1000：1的比例进行提取。

- ③ 液体样本：可直接测定，或者适当稀释后测定。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热30min，调节波长为405nm。
- ② 所有试剂于37°C水浴中预热30min。在96孔板中依次加入下列试剂：

试剂名称(μL)	测定管	空白管（只做一次）
样本	10	
试剂一	140	150
试剂二	20	20
混匀，避光反应，37°C水浴或恒温培养箱孵育20min		
试剂三	30	30
混匀，在37°C下静置5min，立即于405nm下读取吸光值A，ΔA=A测定-A空白。		

【注】：① 最后一步检测时，若有结晶析出，需要37°C复溶再读取吸光值。

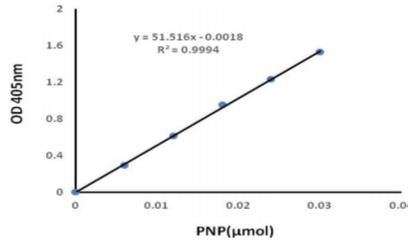
- ② 若ΔA的值非常低在零附近，可增加样本量V1（如增至20μL，则试剂一相应减少）或

延长反应时间 T (如增至 30min 或更长), 则重新调整的 V1 和 T 须代入公式重新计算。

- ③ 若 ΔA 的值超过 1, 则需要稀释样本, 稀释倍数 D 代入计算公式;
- ④ 若样本上清液颜色较深且偏黄色可增加样本自身对照管消除背景色造成的影响, 对照管为: 10 μ L 样本+140 μ L 试剂一+20 μ L 蒸馏水, 37 $^{\circ}$ C 水浴或恒温培养箱孵育 20min 后, 再加 30 μ L 试剂三, 37 $^{\circ}$ C 下静置 5min 后于 405nm 读值, $\Delta A=A$ 测定-A 对照。提醒: 若设定对照管, 则可检测的样本数量会相应减少, 由 96 样减少为 48 样。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 51.516x - 0.0018$, x 是 PNP 摩尔质量: μ mol; y 是 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

酶活定义: 在 37 $^{\circ}$ C 下, 每克组织每分钟水解 1 μ mol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$ACP (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0018) \div 51.516] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 0.1 \times (\Delta A + 0.0018) \div W \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 在 37 $^{\circ}$ C 下, 每毫克蛋白每分钟水解 1 μ mol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$ACP (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0018) \div 51.516] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 0.1 \times (\Delta A + 0.0018) \div Cpr \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算:

酶活定义: 在 37 $^{\circ}$ C 下, 每 10⁴ 个细胞每分钟水解 1nmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$ACP (\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0018) \div 51.516] \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.194 \times (\Delta A + 0.0018) \times D$$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 在 37 $^{\circ}$ C 下, 每毫升液体每分钟水解 1 μ mol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$ACP \text{ 活力} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0018) \div 51.516] \div V1 \div T = 0.1 \times (\Delta A + 0.0018)$$

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 1 mL;

V1---上清液体积 (mL), 0.01mL;

T---反应时间, 20 min。

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

500---细胞数量, 万;

Cpr---上清液蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (10 μ mol/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解, 若有结晶析出, 需 37 $^{\circ}$ C 水浴至完全溶解。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3 μ mol/ml。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照 10 μ L 的各个浓度标准品+160 μ L 试剂一+30 μ L 试剂三, 混匀 5min 后于 405nm 处读值, 根据结果即可制作标准曲线。