

## 抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0932W 微板法 96 样）

### 一、产品简介：

抗酒石酸酸性磷酸酶（Tartrate-Resistant Acid Phosphatase, TRAP）是一种特殊的酸性磷酸酶，因其活性不受酒石酸抑制而得名。它在生理和病理过程中具有重要作用，尤其在骨代谢和某些疾病中备受关注。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 100mL×1 瓶 | 4℃保存 |                                            |
| 试剂一  | 粉剂 mg×2 支    | 4℃保存 | 每支使用前甩几下使粉体落入底部，每支再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用。        |
| 试剂二  | 液体 35mL×1 瓶  | 4℃保存 |                                            |
| 试剂三  | 粉剂 mg×4 支    | 4℃保存 | 每支使用前甩几下使粉体落入底部，再加 0.6mL 试剂二溶解，现配现用，一周内用完。 |
| 试剂四  | 液体 7mL×1 瓶   | 4℃保存 |                                            |
| 标准品  | 粉剂 mg×1 支    | 4℃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、抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）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℃×12000rpm 离心 15min，取上清液待测。

【注】：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 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℃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（ $10^4$ ）：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 30 min，调节波长为 405nm。
- ② 所有试剂于 37℃水浴中预热 30 min。在 96 孔板中依次加入下列试剂：

| 试剂名称(μL)                                                                                                       | 测定管 | 对照管 | 空白管（只做一次） |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----------|
| 样本                                                                                                             | 10  | 10  |           |
| 试剂一                                                                                                            | 10  | 10  | 10        |
| 试剂二                                                                                                            | 140 | 160 | 150       |
| 试剂三                                                                                                            | 20  |     | 20        |
| 混匀，避光反应，37℃水浴或恒温培养箱孵育 20min                                                                                    |     |     |           |
| 试剂四                                                                                                            | 30  | 30  | 30        |
| 混匀，在 37℃下静置 5min，立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$ （每个样本做一个自身对照）。 |     |     |           |

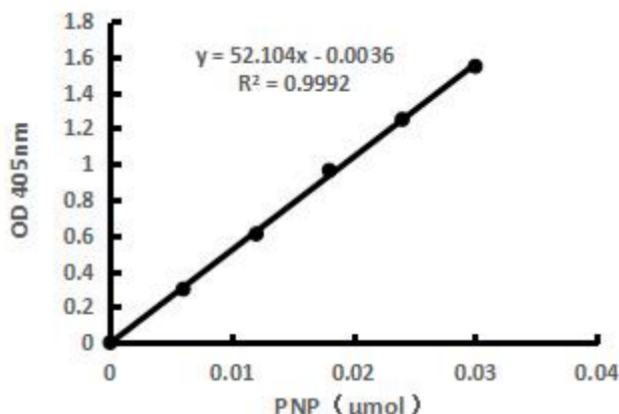
【注】：① 最后一步检测时，若有结晶析出，需要 37°C 复溶再读取吸光值。

② 若  $\Delta A$  值小于 0.01，可增加样本量 V1（如增至 20 $\mu$ L，则试剂二相应减少）或延长反应时间 T（如增至 30min 或更长），或增加取样 W，则重新调整的 V1 和 T 和 W 须代入公式重新计算。

③ 若  $\Delta A$  的值超过 1，则需要稀释样本，稀释倍数 D 代入计算公式。

## 五、结果计算：

1、标准曲线：y = 52.104x - 0.0036，x 是 PNP 摩尔质量： $\mu$ mol；y 是  $\Delta A$ 。



2、按照样本质量计算：

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

$$\text{TRAP } (\mu\text{mol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0036) \div 52.104] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 0.096 \times (\Delta A + 0.0036) \div W \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算：

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

$$\text{TRAP } (\mu\text{mol/min/mgprot}) = [(\Delta A + 0.0036) \div 52.104] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 0.096 \times (\Delta A + 0.0036) \div Cpr \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：在 37°C 下，每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟水解 1nmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{TRAP } (\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0036) \div 52.104] \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 0.192 \times (\Delta A + 0.0036) \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

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

$$\text{TRAP } (\mu\text{mol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0036) \div 52.104] \div V1 \div T = 0.096 \times (\Delta A + 0.0036)$$

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 $\mu$ 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°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  $\mu$ mol/ml。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照 10 $\mu$ L 的各个浓度标准品+170 $\mu$ L 试剂二+30 $\mu$ L 试剂四，混匀 5min 后于 405nm 处读值，根据结果即可制作标准曲线。