

## Acid Phosphatase Activity Assay Kit

### 酸性磷酸酶（ACP）活性测定试剂盒说明书

货号：G0903F | 方法：可见分光法 | 规格：48 样

#### 一、产品简介：

磷酸酶是植一种重要的水解酶。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 40mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×2 瓶	4°C保存	每瓶临用前甩几下使粉体落入底部，再加 2.2mL 试剂一溶解，现配现用，一周内用完。
试剂三	液 6mL×1 瓶	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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、水浴锅、可调式移液器

#### 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，也可以按照组织质量（g）：试剂一体积（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（10<sup>4</sup>）：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 可见分光光度计预热 30 min，设置温度 37°C，调节波长为 405nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂于 37°C水浴中预热 30 min。

③ 在 EP 管中或 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入下列试剂：

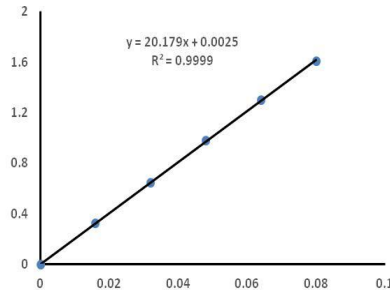
试剂名称（μL）	测定管	空白管（只做一次）
样本	40	
试剂一	560	600
试剂二	80	80
混匀，避光反应，37°C水浴或恒温培养箱孵育 20min		
试剂三	120	120

混匀,在 37°C下静置 5min,全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm),立即于 405nm 下读取吸光值 A,  $\Delta A = A$  测定-A 空白。

注意:本操作流程适用于绝大多数常规样本检测,实验条件可根据实际样本状态适度微调;针对特殊类型样本,我司技术支持可提供专属优化建议。

## 五、结果计算:

1、标准曲线:  $y = 20.179x + 0.0025$ , x 是 PNP 摩尔质量:  $\mu\text{mol}$ ; y 是  $\Delta A$ 。



标准曲线示意图

说明:标准曲线由标准品测定获得,具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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  $1\mu\text{mol}$  PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ACP} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g} \text{ 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0025) \div 20.179] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 0.062 \times (\Delta A - 0.0025) \div W \times D \end{aligned}$$

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  $1\mu\text{mol}$  PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ACP} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg} \text{ prot}) &= [(\Delta A - 0.0025) \div 20.179] \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ &= 0.062 \times (\Delta A - 0.0025) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

4、按细菌/细胞数量计算:

酶活定义:在 37°C下,每  $10^4$  个细胞每分钟水解  $1\text{nmol}$  PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ACP} (\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0025) \div 20.179] \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 0.124 \times (\Delta A - 0.0025) \times D \end{aligned}$$

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  $1\mu\text{mol}$  PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{ACP 活力} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A - 0.0025) \div 20.179] \div V1 \div T = 0.062 \times (\Delta A - 0.0025)$$

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 1 mL;

V1---上清液体积 (mL), 0.04mL;

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。