

抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0932F 分光法 48 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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×4 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 70mL×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 0.9mL 试剂二溶解，现配现用，一周内用完。
试剂四	液体 14mL×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：

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、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，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 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（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 可见分光光度计预热 30 min，调节波长为 405nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂于 37℃水浴中预热 30 min。

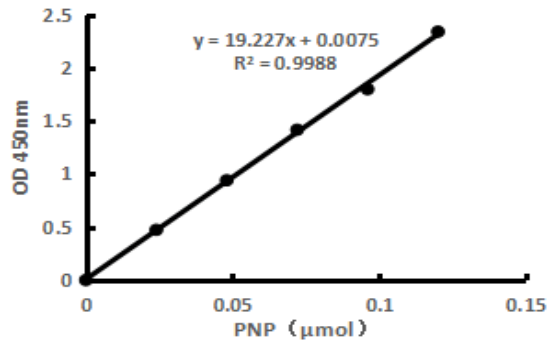
③ 在 EP 管中或 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入下列试剂：

试剂名称（ μ L）	测定管	对照管	空白管（只做一次）
样本	40	40	
试剂一	40	40	40
试剂二	540	600	540
试剂三	60		60
混匀，避光反应，37℃水浴或恒温培养箱孵育 20min			

试剂四	120	120	120
混匀, 在 37°C 下静置 5min, 立即于 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定 - A 对照 - A 空白 (每个样本做一个自身对照)。			

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 19.335x - 0.0039$, x 是 PNP 摩尔质量: μmol ; y 是 ΔA 。



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。

$$\text{TRAP}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0039) \div 19.335] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 0.065 \times (\Delta A + 0.0039) \div W \times D$$

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

$$\text{TRAP}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0039) \div 19.335] \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$

$$= 0.065 \times (\Delta A + 0.0039) \div Cpr \times D$$

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 1nmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{TRAP}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0039) \div 19.335] \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 0.13 \times (\Delta A + 0.0039) \times D$$

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。

$$\text{TRAP}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0039) \div 19.335] \div V1 \div T = 0.065 \times (\Delta A + 0.0039)$$

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。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 ($10\mu\text{mol}/\text{mL}$): 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 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。
- 3 按照 $40\mu\text{L}$ 的各个浓度标准品 + $640\mu\text{L}$ 试剂二 + $120\mu\text{L}$ 试剂四, 混匀 5min 后于 405nm 处读值, 根据结果即可制作标准曲线。