

酸性磷酸酶(ACP)检测试剂盒(PNP 比色法)

简介:

酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)分布极广泛, 遍布各种组织, 主要存在于细胞的溶酶体内, 所以常作为溶酶体标志酶, 溶酶体外的酸性磷酸酶存在于内质网和胞质内, 各种动物中的酸性磷酸酶各有不同, 酸性磷酸酶的适宜 pH 为 4.5~5.5。酸性磷酸酶是一个蛋白家族, 哺乳动物中其分子量从 18kD 到 100kD 不等, 该酶分为两类, 一类为酒石酸盐敏感型, 一类为氟离子敏感型。溶酶体中的酸性磷酸酶为酒石酸盐敏感型, 而红细胞和巨噬细胞中的酸性磷酸酶为氟离子敏感型。

源叶生物 酸性磷酸酶(ACP)检测试剂盒(PNP 比色法)(Acid Phosphatase Colorimetric Assay Kit)检测原理是利用 Para-nitrophenyl phosphate (pNPP)为一种常用的磷酸酶显色底物, 在酸性条件下, 可在酸性磷酸酶的作用下生成 *p*-nitrophenol; 在碱性条件下 *p*-nitrophenol 呈黄色, 产物黄色越深说明酸性磷酸酶活性越高, 反之则酶活性越低, 通过分光光度比色法(分光光度计)测定 400~415nm 处吸光度, 据此通过比色分析就可以计算出酸性磷酸酶活性水平, 可用于检测细胞或组织的裂解液或匀浆液、血浆、血清、尿液等样品中内源性的酸性磷酸酯酶活性。该试剂盒仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

组成:

名称 \ 编号	R21796	Storage
试剂(A): ACP Assay buffer	60T 50ml	4°C
试剂(B): pNPP	2 支	-20°C 避光
试剂(C): <i>p</i> -nitrophenol(10mM)	0.2ml	-20°C 避光
试剂(D): Stopping Solution	80ml	RT
使用说明书	1 份	



自备材料:

- 1、水浴锅或恒温箱
- 2、比色杯
- 3、分光光度计

操作步骤(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以直接用于该试剂盒的测定, 尿液通常也可以直接用于测定, -20°C 冻存, 用于酸性磷酸酶的检测。

②细胞或组织样品: 取恰当细胞或组织裂解液, 如果有必要可用 PBS 或生理盐水进行适当匀浆, 一般细胞数量在 10^6 以上, 组织应在 100mg 以上, 3000-4000g 离心取上清, -20°C 冻存, 用于酸性磷酸酶的检测。

③植物样品: 取适量的植物组织加入少量生理盐水或 PBS, 充分捣碎或研磨, 静置 30min, 用纱布或滤纸过滤, 4000g 离心 20min, 留取上清液并测量体积, -20°C 冻存, 用于酸性磷酸酶的检测。

④高活性样品: 如果样品中含有较高活性的酸性磷酸酶, 可以使用原有的裂解液或 PBS 等进行稀释, 也可以采用 ACP Assay Buffer 稀释。

2、配制显色工作液: 取出 1 支 pNPP, 恢复至室温后溶解于 9ml ACP Assay Buffer, 混匀, 冰上预冷备用。新配制的显色工作液应在 6h 内用完。

3、配制标准品工作液: 取出 *p*-nitrophenol(10mM)恢复至室温后, 取 10 μ l 溶解于 190 μ l ACP Assay Buffer, 使浓度达到 0.5mM 即获得 *p*-nitrophenol (0.5mM), 该试剂 -20°C 保存 2 周有效。用 *p*-nitrophenol(0.5mM)按下表继续稀释标准品:

加入物	1	2	3	4	5	6
ACP Assay Buffer(μ l)	90	80	60	50	20	0
<i>p</i> -nitrophenol(0.5mM)(μ l)	10	20	40	50	80	100
<i>p</i> -nitrophenol 浓度(μ M)	50	100	200	250	400	500

4、ACP 加样: 按照下表设置对照管、标准管、测定管, 溶液应按照顺序



依次加入，并注意避免产生气泡。如果样品中的酸性磷酸酶活性过高，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管。

加入物(ml)	对照管	标准管	测定管
ACP Assay Buffer	0.3	—	—
标准品工作液(1-6号)	—	0.3	—
待测样品	—	—	0.3
显色工作液	0.3	0.3	0.3
混匀，37°C 孵育 25~30min。			
Stopping Solution	1.2	1.2	1.2

5、ACP 测定：以对照调零，比色杯光径 1cm，分光光度计测定 410nm 处标准管、测定管的吸光度(记为 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$)；如果无法检测 410nm，亦可检测 400~415nm 范围内吸光度，一般 15min 内检测完毕。

计算：

酸性磷酸酶活性单位的定义：在 pH4.8 的缓冲液中，37°C 条件下，每分钟水解 para-nitrophenyl phosphate 显色底物产生 1 微摩尔 *p*-nitrophenol 所需的酸性磷酸酶的量定义为一个酶活力单位。加入 0.3ml 的 1 号标准管物质时，其酶活力单位为 $50\mu\text{M}/20\text{min}=2.5\text{U/L}$ ，依次类推，加入浓度分别为 $100\mu\text{M}$ 、 $200\mu\text{M}$ 、 $250\mu\text{M}$ 、 $400\mu\text{M}$ 、 $500\mu\text{M}$ 的 *p*-nitrophenol，活力依次为 5、10、12.5、20、25U/L。以酶活力为横坐标，以对应的吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，根据酶活性定义计算出样品中的酸性磷酸酶活性。血浆中的酸性磷酸酶活性范围 2~7.9U/L，血清中酸性磷酸酶的活性范围在 2.5~11.7U/L，精液(semen)中含有高浓度的酸性磷酸酯酶，活力可以达到 87~436KU/L。

注意事项：

- 1、待测样品中不能含有磷酸酶抑制剂，同时需避免反复冻融。
- 2、建议每次测定时都做标准曲线，以使标准更准确，另外标准品需避免反



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

复冻融。

3、如果没有分光光度计，也可以使用普通的酶标仪测定，但应考虑根据96孔板的最大检测体积。

4、所测样品的值高于标准曲线的上限，应用 ACP Assay Buffer 稀释样品后重新测定。

5、1支显色工作液配制后需当日使用完毕，因此请注意适当多准备一些样品一起检测。

6、*p*-nitrophenol 溶液对人体有害，反应终止液有腐蚀性，请小心操作。

7、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。

8、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 60min。

有效期： 12个月有效。

