酸性磷酸酶(ACP)检测试剂盒(Folin-酚比色法)

产品简介:

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 值为 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。

酸性磷酸酶(ACP)检测试剂盒(Folin-酚比色法)(Acid PhosphataseColorimetric Assay Kit)检测原理是以磷酸苯二钠作为底物，在酸性条件下 ACP 催化底物水解生成苯酚和无机磷，通过 Folin-酚(又称福林酚)测定苯酚的生成量，于分光光度计或酶标仪 680nm 处检测吸光度，以酶促反应时间为横坐标，以产物生成量为纵坐标绘制进程曲线，曲线的起始部分在某一段时间内呈直线，其斜率代表酶促反应的初速度，随着反应时间延长曲线斜率不断下降，因此测定 ACP 酶活力应该在进程曲线的初速度时间范围内进行，主要用于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。

产品组成:

编号 / 名称	GCTE0029 100T	Storage
试剂(A): Phenol(10mM)	1ml	4℃ 避光
试剂(B): 样品稀释液	100ml	4℃
试剂(C): ACP Assay Buffer	1.2ml	4℃ 避光
试剂(D): ACP 终止液	250ml	RT
试剂(E): Folin-酚显色液	9ml	4℃ 避光
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、蒸馏水

2、离心管或试管、水浴锅或恒温箱、比色杯、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℃冻存，用于 ACP 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 NS 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℃冻存，用于 ACP 的检测。

③植物样品：取适量的组织加入 NS 或 PBS，充分捣碎或研磨，静置 30min，用纱布或滤纸过滤，4000g 离心 20min，取上清液并测量体积，-20℃冻存，用于 ACP 的检测。

④高活性样品：可以使用样品稀释液、PBS 或 NS 稀释含有较高活性的样品后再行检测。

2、配制 ACP Assay 工作液：取 ACP Assay Buffer 温浴溶解，按 ACP assay Buffer：样品稀释液=1：19 的比例混合，即为 ACP Assay 工作液。

3、配制 Folin-酚显色工作液：按 Folin-酚显色液： 蒸馏水=1：2 的比例混合即成。

4、稀释标准品：按 Phenol(10mM)：样品稀释液=1：24 的比例配制标准工作液，即 Phenol(0.4mM)，按下表梯度稀释。

加入物(μl)	1	2	3	4	5
Phenol(0.4mM)	50	100	150	200	250
样品稀释液	450	400	350	300	250
Phenol 浓度(mM)	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2

5、ACP 加样：按照下表设置空白管、标准管、测定管、对照管(选做)，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酯酶活性过高，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 2 平行管，求平均值。

加入物(ml)***(提前 35℃预热)***	空白管	标准管	测定管	对照管
样品稀释液	0.5	—	—	—
系列 Phenol 标准	—	0.5	—	—
ACP Assay 工作液	—	—	0.25	0.25
待测样品	—	—	0.25	—
摇匀，立即计时，35℃精确反应 10min，立即加入 ACP 终止液终止反应。空白管和标准管直接进行下边操作。				
ACP 终止液	2.5	2.5	2.5	2.5
Folin-酚显色工作液	0.25	0.25	0.25	0.25
待测样品	—	—	—	0.25
摇匀，35℃保温显色 10min 以上。				

6、ACP 测定：以空白管(或对照管)调零，比色杯光径 1cm，分光光度计测定 680nm 处标准管和测定管的吸光度(记为 $A_{标准}$ 和 $A_{测定}$)。

计算:

ACP 活性单位的定义:在该实验条件下,每分钟每 ml 酶液产生 1μmol 酚(nmol/ml·min)所需的酶量为一个活性单位;以各标准管的吸光度为纵坐标,相应的酚含量为横坐标绘制酚含量-吸光度值曲线,即为标准曲线。根据测得的各待测样品的吸光度,于标准曲线上查出相应的酚含量,乘以稀释倍数后,换算为”nmol/ml·min”的活性单位。

组织或植物粗酶液获得率(ml)=上清液体积(ml)/组织或植物质量×100%

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,但应注意 96 孔板的最大检测体积;虽然酶标仪可以检测,但 推荐采用分光光度计。
4、 注意单次少测几个样品,以免样品过多导致的时间差异较大。
5、 所测样品的值高于标准曲线的上限,应用样品稀释液、PBS 或 NS 稀释样品后重新测定。
6、 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 30min。

有效期: 6 个月有效;常温运输,4℃保存。

相关产品:

产品编号	产品名称
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDF0135	组织细胞固定液(4% PFA)
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCNR0001	DEPC 处理水(0.1%)
GCPS0013	RIPA 裂解液(强)
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)

