酸性磷酸酶(ACP)检测试剂盒(PNP 微板法)

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 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(PNP 微板法)(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。

产品组成:

编号 / 名称	GCTE0033 120T	Storage
试剂(A): ACP Assay buffer	15ml	4℃
试剂(B): pNPP	2 支	-20℃ 避光
试剂(C): *p*-nitrophenol(10mM)	0.3ml	-20℃ 避光
试剂(D): Stopping Solution	20ml	RT
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、 水浴锅或恒温箱

2、 离心机、离心管、96 孔板、酶标仪

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 106 以上，组织应在 100mg 以上，3000~4000g 离心取上清，-20℃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℃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 2.5ml 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 10μl 溶解于 190μl ACP Assay Buffer，使浓度达到 0.5mM 即获得 *p*-nitrophenol(0.5mM)，该试剂-20℃保存 2 周有效。用 *p*-nitrophenol(0.5mM)按下表继续稀释标准品：

加入物(μl)	1	2	3	4	5	6
ACP Assay Buffer	90	80	60	50	20	0
p-nitrophenol(0.5mM)	10	20	40	50	80	100
p-nitrophenol 浓度(μM)	50	100	200	250	400	500

4、ACP 加样：按照下表设置对照孔、标准孔、测定孔，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孔。

加入物(μl)	对照孔	标准孔	测定孔
ACP Assay Buffer	40	—	—
标准品工作液(1-6 号)	—	40	—
待测样品	—	—	40
显色工作液	40	40	40
混匀，37℃孵育 25～30min。			
Stopping Solution	160	160	160

5、ACP 测定：以对照调零，分光光度计测定 410nm 处标准孔、测定孔的吸光度(记为 $A_{标准}$、$A_{测定}$)；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℃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

50uM/20min=2.5U/L，依次类推，加入浓度分别为 100μM、200μM、250μM、400μM、500μM 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复冻融。
3、 如果没有酶标仪，也可以使用普通的分光光度计测定，但应考虑根据比色杯的最小检测体积，尽量采用小体积的比色杯。
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。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCCS0001	ACK 红细胞裂解液(ACK Lysis Buffer)
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)
GCTC0699	植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法)