

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。

Biorigin 酸性磷酸酶(ACP)检测试剂盒(Folin-酚比色法)(Acid Phosphatase Colorimetric 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:

名称	编号	BN27209	Storage
		100T	
试剂(A): Phenol(10mM)		1ml	4°C 避光
试剂(B): 样品稀释液		100ml	4°C
试剂(C): ACP Assay Buffer		1.2ml	4°C 避光
试剂(D): ACP 终止液		250ml	RT
试剂(E): Folin-酚显色液		9ml	4°C 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:

本产品仅用于科研

- 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 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°C 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°C 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°C 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°C 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°C 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 $A_{\text{标准}}$ 和 $A_{\text{测定}}$)。

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 1 μ mol 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 \times 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 $^{\circ}$ C 保存。