

酸性磷酸酶 (ACP) 测试盒

(货号: BC103 微量酶标法)

一、测定原理:

酸性磷酸酶分解磷酸苯二钠, 产生游离酚和磷酸, 酚在碱性溶液中与 4-氨基安替吡啉作用经铁氰化钾氧化生成红色醌衍生物, 根据红色深浅可以测定酶活力的高低。

二、试剂盒组成与配制:

	组份	48T	96T	保存条件
试剂一	缓冲液	3mL×1 瓶	5mL×1 瓶	4℃
试剂二	基质液	3mL×1 瓶	5mL×1 瓶	-20℃
试剂三	碱液	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	4℃避光
试剂四	显色剂	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	4℃避光
试剂五	1.1mg/mL 酚标准贮备液	0.5mL×1 支	0.5mL×1 支	4℃避光

0.1mg/mL 酚标准应用液配制: 按 1.1 mg/mL 酚标准贮备液 : 蒸馏水 =1 : 10 稀释, 现用现配。

(本试剂盒按标示温度保存, 最多可保存 6 个月)

三、样本采集及保存:

- 1、按常规采集样本, 样本可以是血清、血浆 (肝素抗凝为佳)、细胞培养上清、组织或培养细胞。
- 2、样本收集后 (如血清 (浆)、组织、培养细胞、培养上清等) 不能及时检测, 请将样本放置于-20℃以下保存 (温度越低越好)。

四、所需仪器及试剂:

可调 490 ~ 530nm 波长的酶标仪及 96 孔板 (附送一块), 37℃ 恒温箱或水浴锅, 蒸馏水, 生理盐水, 蛋白测定试剂 (组织或细胞样本用, 本公司有售)。

五、样本前处理:

- 1、**血清 (浆):** 解冻后可直接使用 (个别含量过高的样本需稀释后测定, 如鸡血清需要用生理盐水 5-10 倍稀释);
- 2、**细胞培养液:** 将培养液吸出, 加入到离心管中, 2000-4000rpm/分钟离心 5 分钟后取上清待测;
- 3、**组织样本:** 准确称取待测组织的重量, 按重量 (g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 2500 转/分钟, 离心 10 分钟, 取匀浆上清液待测。(匀浆上清液需要测定其蛋白浓度, 该试剂盒本公司有售: 货号 A045-2 或 A045-3/-4)
- 4、**细胞样本:** 首先, **悬浮培养细胞**可直接通过离心收集沉淀细胞 (1000 转/分钟, 离心 10 分钟, 弃上清留沉淀细胞), **贴壁培养的细胞**则吸去培养液, 通过细胞刮直接将细胞刮下, 或者用 0.25% 的胰酶室温消化 2 ~ 3 分钟, 加培养液终止消化, 用微量移液器轻轻吹打, 将所有液体吸出转入 EP 管, 然后 1000 转/分钟, 离心 10 分钟弃上清, 留沉淀细胞, 再加入 1mL PBS 轻轻吹打, 再次 1000 转/分钟, 离心 10 分钟弃上清, 留沉淀细胞待用 (如暂时不做, 则可以将细胞沉淀物低温冻存, 温度越低越好)。然后在收集到的细胞沉淀中加入一定量 (10^6 的细胞一般加 0.3 ~ 0.5mL) 的缓冲液 (缓冲液可以用 PBS 或者是生理盐水), 然后破碎。**第一种破碎方法**是用手动玻璃匀浆器冰水浴研磨 3 ~ 5 分钟, 或者用电动研磨器冰水浴研磨 3 分钟待测; **第二种破碎方法**是**超声破碎** (需保证超声探头在液面以下, 功率 300W, 冰水浴, 每 3 ~ 5S 超声一次, 间隔 4 次

(每次间隔时间为 30S 左右)。第三种破碎方法是化学裂解法(贴壁培养的细胞,可直接将上清吸去后,直接在孔板或是瓶中加入一定量的裂解液(覆盖满细胞),裂解 30~40 分钟(可用显微镜观察细胞破碎情况),再用微量移液器吸出待测。根据需要可用生理盐水或 PBS 进行一定的稀释);破碎好的细胞 2500 转/分钟,离心 10 分钟,取上清液待测。

六、操作表:

	空白孔	标准孔	测定孔
双蒸水 (μL)	4		
0.1mg/mL 酚标准应用液 (μL)		4	
待测样本 (μL)			4
缓冲液 (μL)	40	40	40
基质液 (μL)	40	40	40
轻轻震荡孔板混匀, 37°C 温浴 30 分钟			
碱液 (μL)	80	80	80
显色剂 (μL)	80	80	80
轻轻振荡孔板混匀, 静置 10min, 波长 520nm, 酶标仪测定各孔吸光度			

七、技术参数:

1	空白孔	≤0.150
2	试剂盒批内 CV	≤3%
3	试剂盒批间 CV	≤5%
4	试剂盒回收率	98%
5	线性范围 0~60 金氏单位/100mL	R ² =0.999
6	波长选择范围	490nm~530nm

八、计算公式:

1、液体样本计算公式: (适用于培养液、血清、血浆等液体样本的计算)

定义: 100mL 血清或液体在 37°C 与基质作用 30 分钟产生 1mg 酚为 1 个金氏单位。

计算公式:

$$\text{液体中 ACP 活力 (金氏单位 / 100mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 100 \times N$$

C_{标准}: 酚标准浓度,0.1mg/mL; N: 样本测试前稀释倍数。

举例:

例 1: 取食蟹猴血清 4μL 按照操作表进行 ACP 测定, 得空白孔吸光度为 0.0436, 标准孔吸光度为 0.1845, 测定孔吸光度为 0.1324, 则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{食蟹猴血清中 ACP 活力 (金氏单位 / 100mL)} &= \frac{0.1324 - 0.0436}{0.1845 - 0.0436} \times 0.1 \times 100 \\ &= 6.3023 \text{ 金氏单位 / 100mL} \end{aligned}$$

例 2: 取小鼠血清 4μL 按照操作表进行 ACP 测定, 得空白孔吸光度为 0.0436, 标准孔吸光度为 0.1845, 测定孔吸光度为 0.2575, 则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{小鼠血清中 ACP 活力 (金氏单位 / 100mL)} &= \frac{0.2575 - 0.0436}{0.1845 - 0.0436} \times 0.1 \times 100 \\ &= 15.1809 \text{ 金氏单位 / 100mL} \end{aligned}$$

2、组织计算公式: (适用于培养细胞、组织等相关样本的计算)

定义: 每克组织蛋白在 37°C 与基质作用 30 分钟产生 1mg 酚为 1 个金氏单位。

计算公式:

$$\text{组织、细胞中 ACP 活力 (金氏单位 / g 蛋白)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \text{Cpr}$$

Cpr: 样本蛋白浓度, gprot/mL (prot 指蛋白)。

举例:

例 3 取小鼠肝组织 10% 匀浆用生理盐水 1: 1 稀释后取 4 μ L 进行 ACP 测定, 空白管吸光度 0.0436, 标准吸光度 0.1845, 测定吸光度 0.6013。同时测得该 5% 大鼠肝组织匀浆蛋白浓度为 9.8327 $\times 10^{-3}$ gprot/mL。则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{小鼠肝 ACP 活力 (金氏单位 / gprot)} &= \frac{0.6013 - 0.0436}{0.1845 - 0.0436} \times 0.1 \div (9.8327 \times 10^{-3}) \\ &= 40.2547 \text{ 金氏单位 / gprot} \end{aligned}$$

例 4 小鼠肺组织 10% 匀浆取 4 μ L 进行 ACP 测定, 空白管吸光度 0.0440, 标准吸光度 0.2426, 测定吸光度 0.1392。同时测得该 10% 小鼠肺组织匀浆蛋白浓度为 5.1182 $\times 10^{-3}$ gprot/mL, 则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{小鼠肺 ACP 活力 (金氏单位 / gprot)} &= \frac{0.1392 - 0.0440}{0.2426 - 0.0440} \times 0.1 \div (5.1182 \times 10^{-3}) \\ &= 46.0511 \text{ 金氏单位 / gprot} \end{aligned}$$

九、注意事项:

- 1、如果所用的酶标仪没有此波长, 可以用相近的 510nm 或者 530nm 波长均可, 且 510nm 波长测定结果相对 530nm 更好。
- 2、由于加样量比较少, 建议加样时将吸头靠近酶标板底部, 缓慢加样, 边加边将吸头上移, 以保证吸头上样本残留量最少, 减少加样方面存在的误差。
- 3、所加试剂接近于水剂, 所以对吸头的黏附性很小, 但加试剂时还是需要注意, 速度不宜太快, 以免溅出酶标孔外。
- 4、加样或加试剂若靠壁加入则需靠近底部, 前部分处理反应液量比较少, 若靠近上端加样则会有部分黏附于酶标孔上端, 从而造成反应不完全。
- 5、酶标孔比较小, 所以混匀力度要适中, 太剧烈则可能将液体溅出, 太慢则混匀不充分; 先将孔壁上的液体轻轻的震动落下, 再前后、左右的摇动。
- 6、一般对于酶标板可能存在初始吸光度的差异, 最好在使用之前先在相应的波长处测定其初始的吸光度, 然后再加样测定。
- 7、本试剂盒仅用于科研、实验室。

附录 I: ACP 标准曲线制作

一、样本前处理:

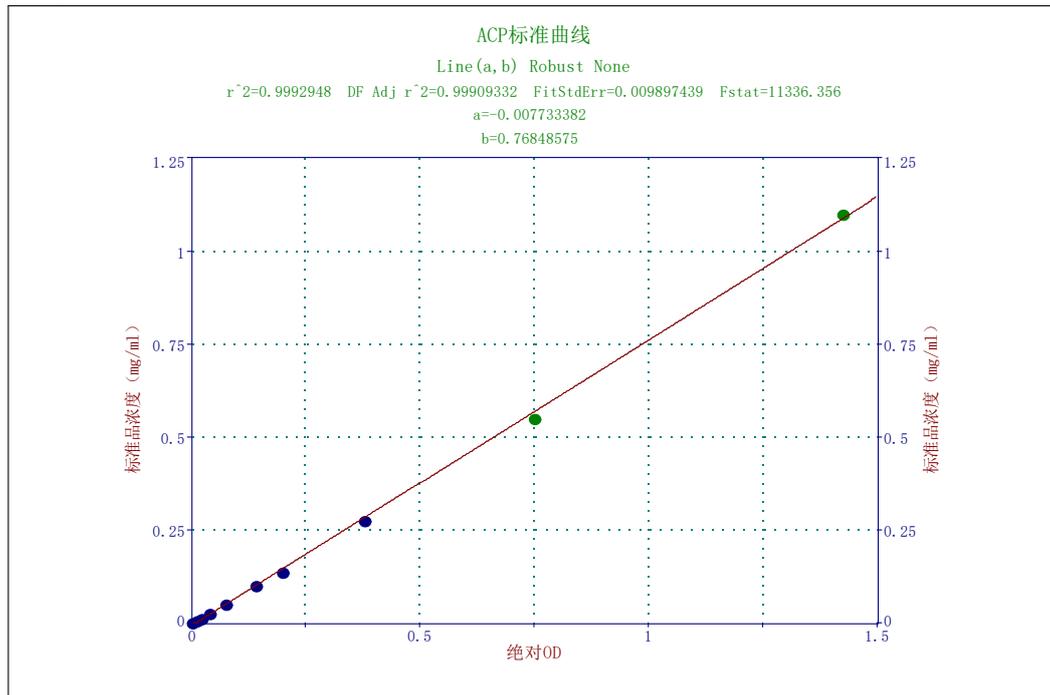
将标准品贮备液用双蒸水分别 2 倍、4 倍、8 倍、11 倍、22 倍、44 倍、88 倍、176 倍稀释, 稀释后浓度为 0.00625mg/mL、0.0125mg/mL、0.025mg/mL、0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.1375mg/mL、0.275mg/mL、0.55 mg/mL、1.1 mg/mL

二、操作表:

	空白孔	标准孔
双蒸水 (μL)	4	
不同浓度酚标准应用液 (μL)		4
缓冲液 (μL)	40	40
基质液 (μL)	40	40
轻轻振摇孔板混匀, 37°C 温浴 30 分钟		
碱液 (μL)	80	80
显色剂 (μL)	80	80
轻轻振摇孔板混匀, 静置 10min, 波长 520nm, 酶标仪测定各孔吸光度		

三、测定结果:

以所测得绝对吸光度 OD 值为横坐标, 以相应的标准品浓度单位为纵坐标, 绘制标准曲线。



注: 标准曲线客户可以不做, 直接按计算公式计算即可, 不影响测定及结果。