

## 酸性磷酸酶(ACP)检测试剂盒(Folin-酚比色法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

### 产品简介：

酸性磷酸酶(acidphosphatase, 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)(AcidPhosphataseColorimetricAssayKit)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                   | 规格    |       | 保存条件 |
|----------------------|-------|-------|------|
| 酸性磷酸酶(ACP)检测试剂盒      | 50T   | 100T  | 4℃   |
| 试剂(A):Phenol(10mM)   | 1ml   | 1ml   | 4℃避光 |
| 试剂(B):样品稀释液          | 50ml  | 100ml | 4℃   |
| 试剂(C):ACPAssayBuffer | 0.6ml | 1.2ml | 4℃避光 |
| 试剂(D):ACP 终止液        | 125ml | 250ml | RT   |
| 试剂(E):Folin-酚显色液     | 4.5ml | 9ml   | 4℃避光 |
| 使用说明书                | 1 份   |       |      |
| 有效期                  | 6 个月  |       |      |

### 自备材料：

- 1、蒸馏水
- 2、离心管或试管
- 3、水浴锅或恒温箱

- 4、比色杯或 96 孔板
- 5、分光光度计或酶标仪

#### 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 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 ACPAssay 工作液: 取 ACPAssayBuffer 温浴溶解, 按 ACPAssayBuffer: 样品稀释液=1: 19 的比例混合, 即为 ACPAssay 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  | —    | —    |
| ACPAssay 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。<br>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  $1 \mu\text{mol}$  酚( $\text{nmol}/\text{ml} \cdot \text{min}$ )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“ $\text{nmol}/\text{ml} \cdot \text{min}$ ”的活性单位。

组织或植物粗酶液获得率( $\text{ml}$ )= $\text{上清液体积}(\text{ml})/\text{组织或植物质量} \times 100\%$

**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。