

酸性磷酸酶（ACP）活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/48S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

ACP在酸性条件下催化磷酸单酯水解称无机磷酸，常见于巨噬细胞的溶酶体内。ACP常用于前列腺癌的辅助诊断。

测定原理：

在酸性环境中，ACP催化对硝基苯磷酸二钠水解生成4-硝基苯酚，在405nm有特征光吸收；通过测定405nm吸光度增加速率，来计算ACP活性。

自备实验用品及仪器：

酶标仪、96孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体60 mL×2瓶，4℃保存。

试剂二：液体50 mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：液体50 mL×1瓶，4℃保存。

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1 mL试剂一）进行冰浴匀浆，4℃、10000g离心10 min，取上清液待测。
2. 细菌或细胞：按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1 mL试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3 min）；然后10000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
3. 血液可直接测定，或者适当稀释后测定。

测定：

1. 酶标仪预热30 min，调节波长到405 nm。

2. 在 EP 管中加入下列试剂

试剂名称（ μ L）	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	90	990
试剂二	900	
30℃避光保温30 min		
试剂三	400	400

混匀，吸取 200 μ L 加入96 孔板中，405 nm 下测定各管吸光值。 $\Delta A=A_{\text{测定管}}-A_{\text{对照管}}$ 。

酸性磷酸酶（ACP）活性测定试剂盒说明书注意：每个测定管需做一个对照管。

ACP活性计算：

标准曲线 $y = 7.3336x + 0.0179$ ； $R^2 = 0.9996$ ； x 为标准品浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）， y 为吸光值 ΔA 。

1. 血液中ACP活性计算

活性单位定义：30 $^{\circ}$ C中每毫升血液每分钟催化产生1 μmol 4-硝基苯酚定义为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{ACP活力}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) &= (\Delta A - 0.0179) \div 7.3336 \times V_{\text{反总}} \div T \div V_{\text{样}} \\ &= 0.4545 \times (\Delta A - 0.0179)\end{aligned}$$

2. 组织、细菌或细胞中ACP活性计算

(1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义：30 $^{\circ}$ C中每毫克蛋白每分钟催化产生1 μmol 4-硝基苯酚定义为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{ACP活力}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0179) \div 7.3336 \times V_{\text{反总}} \div T \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \\ &= 0.4545 \times (\Delta A - 0.0179) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：30 $^{\circ}$ C中每克组织每分钟催化产生1 μmol 4-硝基苯酚定义为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{ACP活力}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0179) \div 7.3336 \times V_{\text{反总}} \div T \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 0.4545 \times (\Delta A - 0.0179) \div W\end{aligned}$$

(3) 按照细菌或细胞数量计算

活性单位定义：30 $^{\circ}$ C中每 10^4 个细菌或细胞每分钟催化产生1 μmol 4-硝基苯酚定义为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{ACP 活力}(\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0179) \div 7.3336 \times V_{\text{反总}} \div T \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 0.4545 \times (\Delta A - 0.0179) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积（mL），1 mL； W ：样品质量，g； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中样本体积（mL），0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：提取液体积，1 mL； T ：反应时间（min），30 min；500：细胞或细菌总数，500万。

注意事项：

ACP不稳定，尤其在37 $^{\circ}$ C和pH大于7的条件下活力丧失快，因此酸性磷酸酶样品一般需当天准备；血清样品中，每毫升血清中加入10mg柠檬酸氢二钠或者5mg硫酸氢钠，使pH降至6.5以下，或5ml血清加入30%醋酸溶液2~3滴，置于4 $^{\circ}$ C可保存1周。