

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。

自备仪器和用品：

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（10⁴ 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（μL）	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 200μL 加入 96 孔板中，405 nm 下测定各管吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

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°C 中每毫升血液每分钟催化产生 $1 \mu\text{mol}$ 4-硝基苯酚定义为 1 个酶活单位。

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

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°C 中每毫克蛋白每分钟催化产生 $1 \mu\text{mol}$ 4-硝基苯酚定义为 1 个酶活单位。

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

(2) 按照样本质量计算

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

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

(3) 按照细菌或细胞数量计算

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

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

$V_{\text{反总}}$: 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°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°C 可保存 1 周。