



酸性磷酸酶（ACP）测试盒说明书

(货号：A060-2 微板法)

免责声明：测试前请仔细阅读说明书，预试后再进行批量实验，否则由此导致的后果用户自行承担！

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、试剂组成与配制：

	组份	48T (A060-2-1)	96T (A060-2-2)	保存条件
试剂一	缓冲液	3mL×1 瓶	5mL×1 瓶	4℃避光
试剂二	基质液	3mL×1 瓶	5mL×1 瓶	-20℃避光
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 酚标准储备液	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 酚标准储备液：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：

- 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。
- 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：

- 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）；
- 细胞培养液：**将培养液吸出，加入到离心管中，1000-1500 rpm 离心 5 分钟后取上清待测；
- 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，4000rpm 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）
- 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 rpm，离心 10 分钟，弃上清留沉淀细胞），**贴壁培养**的细胞可通过细胞刮直接将细胞刮下，或者吸去培养液，再用 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 1000rpm 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 rpm 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（10⁶ 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，或者是用卡富隆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，每次超声 3~5S，间隔重复 3-5 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 4000 rpm 离心 10 分钟，取上清液待测。

注：正式实验前需要取 2 例预期差异最大的样本进行预试，若酶活力过高可将其稀释后 A_{测定}-A_{空白}控制在 0.2 左右，若酶活力较低，则可增加上样量测定（空白孔蒸馏水等量增加；标准孔标准品稀释相应倍数后等量增加）或延长 37℃ 反应时间，使得 A_{测定}-A_{空白}尽量大于 0.02。

六、操作表：

	空白孔	标准孔	测定孔
蒸馏水（μL）	4		
0.1mg/mL 酚标准应用液（μL）		4	
待测样本（μL）			4
试剂一（μL）	40	40	40
试剂二（μL）	40	40	40
轻轻震荡孔板混匀，37℃温浴 30 分钟			
试剂三（μL）	80	80	80
试剂四（μL）	80	80	80
轻轻振荡孔板混匀，室温避光静置 10min，波长 520nm，酶标仪测定各孔吸光度值 A			

七、单位定义及计算公式：

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℃ 与基质作用 30 分钟产生 1mg 酚为 1 个金氏单位。

计算公式：

$$\text{液体中 ACP 活力} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 100 \times N$$

（金氏单位 / 100mL）

C_{标准}：酚标准浓度,0.1mg/mL; **N:**样本测试前稀释倍数。

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℃ 与基质作用 30 分钟产生 1mg 酚为 1 个金氏单位。

计算公式：

$$\text{组织、细胞中 ACP 活力} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

（金氏单位 / g 蛋白）

C_{pr}：样本蛋白浓度，gprot/mL（prot 指蛋白）。

八、注意事项：

- 如果所用的酶标仪没有 520nm 波长，可在 490nm~530nm 范围内选择，越靠近 520nm 越好，且 510nm 相较 530nm 更好。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 一般对于 96 孔板可能存在初始吸光度的差异，可在使用之前先在相应的波长处测定其空板时的吸光度，然后再加样测定，计算时各孔测得值均先减去对应孔的空孔值再代入公式计算。
- 本试剂盒仅用于科研、实验室。

九、技术参数：

1	空白孔吸光度值	≤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

附录 I： ACP 标准曲线制作（选做）

一、前处理：

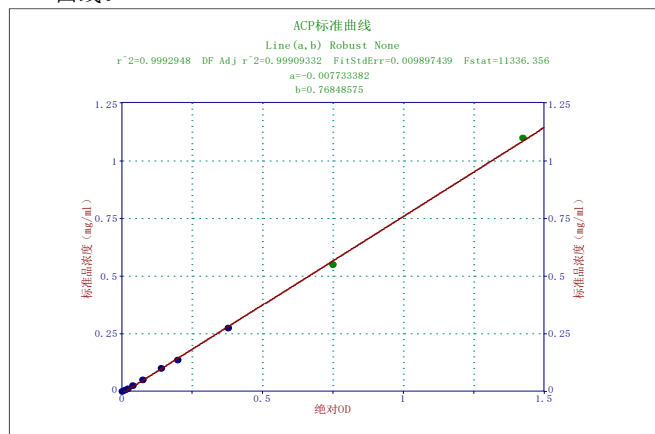
将标准品贮备液用蒸馏水分别 2 倍、4 倍、8 倍、11 倍、22 倍、44 倍、88 倍、176 倍稀释，稀释后浓度为 0.00625mg/mL、0.0125mg/mL、0.025mg/mL、0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.1375mg/mL、0.275mg/mL、0.55 mg/mL、1.1 mg/mL

二、操作表：

	空白孔	标准孔
蒸馏水（μL）	4	
不同浓度酚标准应用液（μL）		4
试剂一（μL）	40	40
试剂二（μL）	40	40
轻轻振摇孔板混匀，37℃温浴 30 分钟		
试剂三（μL）	80	80
试剂四（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值 A		

三、测定结果：

以所测得绝对吸光度值（即各标准孔吸光度值减去空白孔吸光度值）为横坐标，以相应标准品浓度为纵坐标，绘制标准曲线。



注：标准曲线可以不做，直接按计算公式计算即可，不影响测定及结果。若是有做标曲，则可将样本测定孔吸光值减去空白孔吸光值后，代入标曲计算得到的值替换前面公式中的 $\frac{A_{测定} - A_{空白}}{A_{标准} - A_{空白}} \times C_{标准}$ ，再继续运算，即可得最终结果。