

## 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（ $10^4$  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（ $\mu$ 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 $\mu$ L 加入 96 孔板中，405 nm 下测定各管吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

**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  $\Delta A$ 。

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。

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

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°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。

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

(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。

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

(3) 按照细菌或细胞数量计算

活性单位定义：30°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。

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

$V_{\text{反总}}$ ：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°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。