

酸性磷酸酶（ACP）活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

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：

可见分光光度计、台式离心机、分析天平、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、冰、可调式移液器和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 60mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 25mL×1 瓶，4℃保存。

试剂三：液体 25mL×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 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆，4℃、10000g 离心 10min，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 1mL 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 3min）；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. 分光光度计预热 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 1 mL 加入玻璃比色皿中，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 $y = 14.6672x + 0.0179$ ； $R^2 = 0.9996$ ；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℃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。

$$\text{ACP 活力}(\mu\text{mol/min/mL}) = (\Delta A - 0.0179) \div 14.6672 \times V_{\text{反总}} \div T \div V_{\text{样}} \\ = 0.2273 \times (\Delta A - 0.0179)$$

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℃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。

$$\text{ACP 活力}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot})=(\Delta\text{A}-0.0179)\div 14.6672\times\text{V 反总}\div\text{T}\div(\text{V 样}\times\text{Cpr})$$
$$=0.2273\times(\Delta\text{A}-0.0179)\div\text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：30℃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。

$$\text{ACP 活力}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=(\Delta\text{A}-0.0179)\div 14.6672\times\text{V 反总}\div\text{T}\div(\text{W}\times\text{V 样}\div\text{V 样总})$$
$$=0.2273\times(\Delta\text{A}-0.0179)\div\text{W}$$

(3) 按照细菌或细胞数量计算

活性单位定义：30℃中每 10⁴ 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。

$$\text{ACP 活力}(\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=(\Delta\text{A}-0.0179)\div 14.6672\times\text{V 反总}\div\text{T}\div(\text{细胞数量}\times\text{V 样}\div\text{V 样总})$$
$$=0.2273\times(\Delta\text{A}-0.0179)\div\text{细胞数量}$$

V 反总：反应体系总体积 (mL)，1 mL； W：样品质量，g； V 样：加入反应体系中样本体积 (mL)，0.01 mL； V 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℃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℃可保存 1 周。