

## 酸性磷酸酶（ACP）活性测定试剂盒（微量法）

**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。

### 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：

- 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。
- 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。
- 血液可直接测定，或者适当稀释后测定。

### 测定步骤：

- 酶标仪预热 30 min，调节波长到 405 nm。
- 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:  $30^\circ\text{C}$  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:  $30^\circ\text{C}$  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。

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

#### (2) 按照样本质量计算

活性单位定义:  $30^\circ\text{C}$  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:  $30^\circ\text{C}$  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  $37^\circ\text{C}$  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  $4^\circ\text{C}$  可保存 1 周。