

抗氟离子酸性磷酸酶检测试剂盒

抗氟离子酸性磷酸酶检测试剂盒

该试剂盒可用于快速、便捷地检测细胞、组织的裂解液或匀浆液、血浆、血清、尿液等样品中内源性的抗氟离子酸性磷酸酯酶活性的试剂盒。

酸性磷酸酶(Acid Phosphatase), 也称酸性磷酸酯酶, 在酸性条件下可以催化磷酸酯键的水解。在哺乳动物中其分子量从 18kD 到 100kD 不等。酸性磷酸酶主要分为两类, 一类为抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP), 一类为抗氟离子酸性磷酸酶(fluoride resistant acid phosphatase, FRAP)。

抗氟离子酸性磷酸酶包括在绝大多数细胞的溶酶体中表达的溶酶体酸性磷酸酶、前列腺、脑、肝脏、脾脏和血小板中表达的酸性磷酸酶。抗氟离子酸性磷酸酶在前列腺中的表达水平非常高, 当前列腺发生癌变并出现转移时抗氟离子的前列腺特异性酸性磷酸酶活性水平最高。当前列腺发生病变时会导致血液中抗氟离子酸性磷酸酶活性显著升高。同时, 血液中检测到抗氟离子酸性磷酸酶活性升高时, 通常是前列腺发生病变。因此, 血清或血浆中抗氟离子酸性磷酸酶活性水平的升高, 常被用作前列腺癌等前列腺病变的指标。

Para-nitrophenyl phosphate (pNPP)是一种常用的磷酸酶显色底物, 在酸性条件下, 可在酸性磷酸酶作用下生成 para-nitrophenol。para-nitrophenol 在碱性条件下, 呈黄色产物, 可以在 405nm 检测吸光度。产物黄色越深, 说明酸性磷酸酶活性越高, 反之则酶活性越低。据此通过比色分析就可以计算出酸性磷酸酶活性水平。在适量的氟离子存在的情况下进行酸性磷酸酶的活性检测, 检测得到的酸性磷酸酶活性就是抗氟离子酸性磷酸酶活性。

包括标准品和空白对照, 本试剂盒共可进行 120 个样品的检测。

使用说明

1. 试剂准备: 将所有试剂取出, 恢复至室温使用。

1) 显色底物溶液: 取一管显色底物, 溶解于 2.5mL 的检测缓冲液中, 充分溶解和混匀, 冰上放置。新鲜配制的显色底物溶液需在 6h 内使用。

2) 标准品工作液: 取 10 μ L p-nitrophenol 溶液(10mM), 用检测缓冲液稀释至 0.2mL, 最终浓度为 0.5mM。

2. 样品准备:

1) 细胞或组织裂解液的准备: 采用适当细胞或组织裂解液裂解细胞和细胞, 如果有必要需进行适当匀浆, 随后离心取上清, 用于抗氟离子酸性磷酸酯酶的检测。注意: 裂解液中不能含有磷酸酶抑制剂。样品可以-80 $^{\circ}$ C冻存, 但需避免反复冻融。

2) 血浆、血清和尿液的准备: 血浆和血清按照常规方法制备后可以直接用于本试剂盒的测定, 但为了消除样品本身颜色的干扰, 需设置加了血浆或血清但不加底物的对照。尿液通常也可直接用于测定。上述样品可以-80 $^{\circ}$ C冻存, 但需避免反复冻融。

3) 样品的稀释: 如果样品中含有较高活性的抗氟离子酸性磷酸酶, 可以使用原有的裂解液或 PBS 等进行稀释, 也可以采用试剂盒中的检测缓冲液进行稀释。如果使用试剂盒中提供的检测缓冲液进行稀释, 需注意保留足够的检测缓冲液用于试剂盒的检测过程。

3. 将底物溶液在 37 $^{\circ}$ C 下平衡, 将酶标仪的检测波长设置为 405nm;

4. 参考下表使用 96 孔板设置空白对照孔、标准品孔和样品孔。标准品的用量分别为 4、8、

16、24、32 和 40 μ L，样品通常加 40 μ L。如果样品中的抗酒石酸酸性磷酸酯酶活性过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定。样品的检测最好能设置平行孔或三复孔。

	空白对照(Blank)	标准品(Standard)	样品(Sample)
检测缓冲液	40 μ L	(80-X) μ L	(40-Y) μ L
显色底物	40 μ L	—	40 μ L
氟离子溶液	5 μ L	5 μ L	5 μ L
样品	—	—	Y μ L
标准品工作液	—	X μ L	—

- 使用微板振荡器混合，或用枪头轻轻吹打混匀，也可借助摇床进行混匀。
- 37 $^{\circ}$ C 孵育 5-10min。(说明：待测样品中抗氟离子酸性磷酸酶活性较低时，可适当延长孵育时间至 30min)
- 每孔加入 160 μ L 反应终止液终止反应。此时，标准品或有抗氟离子酸性磷酸酯酶活性的孔会呈现不同深浅的黄色。
- 在 405nm 测定吸光度。
- 酸性磷酸酶活性单位的定义：在 pH4.8，37 $^{\circ}$ C 条件下，每分钟水解 para-nitrophenyl phosphate 显色底物产生 1 μ M p-nitrophenol 所需的酸性磷酸酶的量定义为一个酶活力单位。
- 根据酶活性定义，计算出样品中的抗氟离子酸性磷酸酯酶活性。

温馨提示

- 为了您的自身安全，使用试剂前，请做好防护，如穿实验服，带手套等。
- 如果希望进行酶活性的绝对定量，进行酶反应时必须注意精确计时。此时推荐采用孵育 30min 等较长的时间，以减小操作过程中的时间误差。
- 一管显色底物配制后需当日使用完毕，因此请注意适当多准备一些样品一起检测，以避免试剂盒浪费。
- 样品溶液中须避免出现各种酸性磷酸酶抑制剂。
- 氟离子溶液和 p-nitrophenol 溶液对人体有害，请注意适当防护。反应终止液有腐蚀性，请小心操作。

储存温度

检测缓冲液、反应终止液 4 $^{\circ}$ C 保存，其余 -20 $^{\circ}$ C 保存，一年有效。其中显色底物和 p-nitrophenol 溶液需避光保存。

包装清单

货号	品名	包装
HT016A	检测缓冲液	50mL
HT016B	显色底物	2 管
HT016C	氟离子溶液	1mL
HT016D	p-nitrophenol 溶液(10mM)	0.1mL
HT016E	反应终止液	20mL
	说明书	1 份