

Tartrate Resistant Acid Phosphatase Assay Kit

抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)活性染色试剂盒

产品简介

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。酸性磷酸酶是一个蛋白家族, 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。

抗酒石酸酸性磷酸酶是一种糖基化的含金属蛋白酶, 在破骨细胞(osteoclast)和破软骨细胞(chondroclast)中高表达。在活化的巨噬细胞和神经元中也有表达。抗酒石酸酸性磷酸酶在细胞信号转导、细胞增殖和分化等方面起重要作用, 也和活性氧产生和铁离子转运等有关。抗酒石酸酸性磷酸酶可以被破骨细胞释放到血液中, 几乎被认为是机体破骨活性的唯一血液指标。

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 (p-nitrophenol)在碱性条件下, 呈黄色产物, 可以在 400-415nm 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。在适量的酒石酸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酒石酸酸性磷酸酶活性。

本试剂盒抗酒石酸酸性磷酸酶检测试剂盒(Tartrate Resistant Acid Phosphatase Assay Kit)是一种用于快速、便捷地检测细胞或组织样品的裂解或匀浆产物的上清液、血浆、血清、尿液等样品中内源性的抗酒石酸酸性磷酸酯酶活性的试剂盒。包括标准品和空白对照, 本试剂盒共可进行 100-120 个样品的检测。

产品组成

组分编号	组分名称	组分规格	保存温度
FS0511-A	检测缓冲液 ACP Assay Buffer	15ml	-20℃
FS0511-B	显色底物 pNPP	2 管	-20℃ 避光
FS0511-C	酒石酸溶液 Tartrate Solution	1ml	-20℃
FS0511-D	p-nitrophenol 溶液(10mM)	0.3ml	-20℃ 避光
FS0511-E	反应终止液 Stopping Solution	20ml	-20℃
使用说明书		1 份	

存储条件: -20℃ 保存, 一年有效。

操作步骤:

1. 试剂准备:

1-1 将试剂盒所有试剂取出, 恢复至室温使用。

1-2. 显色底物溶液配置: 取一管试剂 B 显色底物 ACP Assay Buffer, 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 6 小时内使用。

1-3. 标准品工作液配置: 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。

按下表继续稀释:

加入物(μl)	1	2	3	4	5	6
p-nitrophenol(0.5mM)	4	8	16	24	32	40
ACP Assay Buffer	36	32	24	16	8	0
p-nitrophenol 含量(μM/4μl)	0.002	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02

2. 样品准备:

2-1. 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或组织, 建议使用 Western 及 IP 细胞裂解液(无抑制剂) (推荐货号 CAT:FS1008) 裂解相关样品。如果有必要需进行适当匀浆, 随后离心取上清, 用于抗酒石酸酸性磷酸酶的检测。注意: 裂解液中不能含有磷酸酶抑制剂。一般细胞数量在 10^6 以上, 组织应在 100mg 以上, 3000~4000g 离心取上清样品可以-80℃冻存, 但需避免反复冻融。

2-2. 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。尿液通常也可以直接用于测定。上述样品可以-80℃冻存, 但需避免反复冻融。

2-3. 样品的稀释: 如果样品中含有较高活性的抗酒石酸酸性磷酸酯酶, 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。

2-4. 植物样品: 取适量的植物组织加入少量 PBS 或生理盐水, 充分捣碎或研磨, 静置 30min, 用纱布或滤纸过滤, 4000g 离心 20min, 留取上清液并测量体积, -20℃冻存, 用于 TRAP 的检测。

2-5. 高活性样品: 如果样品中含有较高活性的 TRAP, 可以使用 ACP Assay Buffer、PBS 或生理盐水稀释后再进行检测。

3. 参考下表 TRAP 加样: 按按照下表设置空白孔、标准孔、空白孔, 溶液应按照顺序依次加入, 并注意避免产生气泡; 如果样品中的 TRAP 活性过高, 可以减少样品用量或适当稀释后再进行检测, 样品的检测最好能设置平行孔。

组分名称	空白对照(Blank)	标准品(Standard)	样品(Sample)
检测缓冲液 ACP Assay Buffer	4 μl	—	—
显色底物	40 μl	40 μl	40 μl
酒石酸溶液 Tartrate Solution	5 μl	5 μl	5 μl
样品	—	—	4 μl
标准品工作液 (1~6 号)	—	4 μl	—

4. 用枪头轻轻吹打混匀, 也可借助摇床进行混匀。

5. 37℃孵育 5-10 分钟。(说明: 待测样品中酒石酸酸性磷酸酶活性较低时, 可适当延长孵育时间至 30 分钟)

6. 每孔加入 160 μl 反应终止液终止反应。此时, 标准品或有酒石酸酸性磷酸酶活性的孔会呈现不同深浅的黄色。

7. 在 405nm 测定吸光度。如果不能测定 405nm, 也可以在 400-415nm 范围内检测吸光度。如果不能立即测定, 可以在数小时内完成测定, 所显现的黄色在数小时内稳定。

8. 酸性磷酸酶活性单位的定义: 在 pH4.8, 37℃条件下, 每分钟水解 para-nitrophenyl phosphate 显色底物产生 1 微摩尔 p-nitrophenol 所需的酸性磷酸酶的量定义为一个酶活力单位。

9. 根据酶活性定义，计算出样品中的抗酒石酸酸性磷酸酯酶活性。

计算：系列标准品(1~6号)浓度(即 p-NP 含量)0.002、0.004、0.008、0.012、0.016、0.02 μM 为横坐标，以对应的标准孔吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，根据测定孔的吸光度在标准曲线上查得待测样品 p-NP 的生成量。

酸性磷酸酶活性单位的定义：在 pH 值 4.8 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，每分钟水解 pNPP 显色底物产生 1 μM p-NP 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，计算出样品中的抗酒石酸酸性磷酸酶活性。

TRAP 酶活性($\mu\text{M}/\text{min}$)=待测样品 p-NP 生成量/孵育时间

注意事项：

1. 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 30 分钟等较长的时间，以减小操作过程中的时间误差。同时如果样品中酶活性较高，则可以预先适当稀释样品。
2. p-nitrophenol 溶液对人体有害，反应终止液有腐蚀性，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
3. 样品溶液中须避免出现各种酸性磷酸酶抑制剂。
4. 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。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

