（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K010-M

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(400-415 nm)

Elabscience®酸性磷酸酶(ACP)比色法测试盒

(对硝基苯磷酸二钠法)

Acid Phosphatase (ACP) Activity Assay Kit

(PNPP Method)

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动植物组织样本中的酸性磷酸酶的酶活。

检测原理

对硝基苯磷酸二钠(p-NPP)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对硝基苯酚。对硝基苯酚在碱性条件下，呈黄色产物，可在 400-415nm 检测吸光度。产物黄色越深，说明酸性磷酸酶检活性越高，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。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	20 mL×1 瓶	-20°C 保存 12 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×3 支	-20°C 避光 保存 12 个月
试剂三 (Reagent 3)	标准品 (Standard)	粉剂×1 瓶	-20°C 避光 保存 12 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	24 mL×1 瓶	-20°C 保存 12 个月
	96 孔酶标板	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪 (400-415 nm，最佳检测波长 405 nm)，恒温箱(37℃)

试剂：PBS (0.01 mol/L，pH 7.4)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液的配制:

取一支试剂二加入1.6 mL试剂一溶解，避光，未用完部分-20℃可保存1天。

③ 10 mmol/L标准品储备液的配制:

每瓶试剂三中加入5 mL双蒸水，充分溶解待用，分装后-20℃密封可避光保存7天。

④ 0.5 mmol/L标准品的稀释:

按10 mmol/L标准品储备液：试剂一= 1: 19的体积比混匀，现用现配，按需配制，避光待用。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	**0**	**0.05**	**0.1**	**0.2**	**0.25**	**0.3**	**0.4**	**0.5**
0.5 mmol/L 标准品 (μL)	0	20	40	80	100	120	160	200
试剂一(μL)	200	180	160	120	100	80	40	0

样本准备

① 样本处理

血清血浆样本：直接测定。

组织样本：组织处理的匀浆介质为 PBS (0.01 mol/L，pH 7.4)(若上清液浑浊可二次离心)。匀浆后，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.2-50 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%绿萝组织	5-10	10%大鼠脾脏组织	20-30
小鼠血浆	5-10	10%大鼠肝脏组织	20-30
大鼠血浆	5-10	10%大鼠肾脏组织	20-30
人尿液	不稀释	人血浆	5-10

注：稀释液为 PBS(0.01 mol/L，pH 7.4)。

实验关键点

① 试剂一使用前分装出一部分，避免试剂污染。

② 试剂二工作液和标准品溶液需避光。

③ 试剂二工作液需要在 1 天内使用完，请合理安排检测时间。

操作步骤

① 标准孔：取 40 μL 不同浓度的标准品溶液加入对应酶标孔。

对照孔：取 40 μL 样本加入对应酶标孔。

测定孔：取 40 μL 样本加入对应酶标孔。

② 向步骤①中标准孔和对照孔加入 40 μL 试剂一，测定孔加入 40 μL 试剂二工作液。

③ 振板 3 s，37℃孵育 10 min。

④ 向步骤③各孔加入 160 μL 试剂四。

⑤ 酶标仪于 405 nm 波长测定各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	**测定孔**	**对照孔**
不同浓度的标准品(μL)	40		
待测样本(μL)		40	40
试剂一(μL)	40		40
试剂二工作液(μL)		40	
振板 3 s，37°C 下孵育 10 min			
试剂四(μL)	160	160	160
振板 3 s，酶标仪于 405 nm 波长测定各孔 OD 值			

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax + b

组织样本中 ACP 活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每克组织蛋白每分钟水解对硝基苯磷酸二钠产生 1 μmol 对硝基苯酚所需要的 ACP 酶量为一个活力单位。

$$\text{ACP 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{405} - b) \div a \div T \div C_{pr} \times f \times 1000^{*}$$

血清(浆)样本中 ACP 活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每升液体样本每分钟水解对硝基苯磷酸二钠产生 1 μmol 对硝基苯酚所需要的 ACP 酶量为一个活力单位。

$$\text{ACP 活力 (U/L)} = (\Delta A_{405} - b) \div a \div T \times f \times 1000^{*}$$

注解：

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

ΔA_{405}：样本测定孔 OD 值-对照孔 OD 值

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

T：孵育反应时间，10 min

C_{pr}：组织样本蛋白浓度：gprot/L

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

1000*：单位换算，1 mmol=1000 μmoL

附录1 关键数据

1. 技术参数

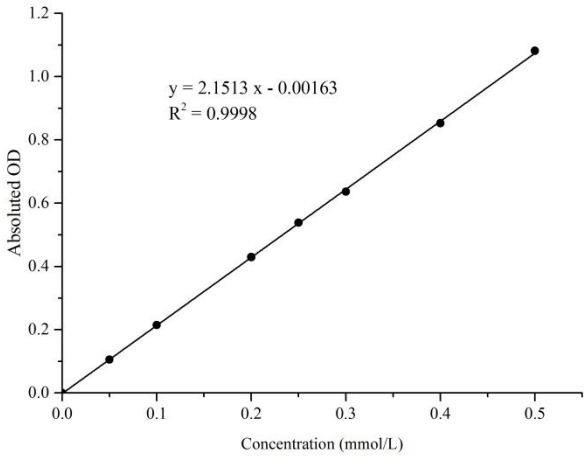
检测范围	0.2-50 U/L	**平均批间差**	4.5 %
灵敏度	0.2 U/L	**平均批内差**	2.8 %

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量40 μL，按照操作步骤进行实验，各点OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	**0**	**0.05**	**0.1**	**0.2**	**0.25**	**0.3**	**0.4**	**0.5**
OD 值	0.039	0.146	0.255	0.473	0.539	0.677	0.891	1.083
	0.040	0.144	0.254	0.465	0.617	0.674	0.893	1.159
平均 OD 值	0.039	0.145	0.254	0.469	0.577	0.675	0.892	1.121
绝对 OD 值	0	0.105	0.214	0.429	0.538	0.636	0.852	1.081

②绘制标曲(如下图)：



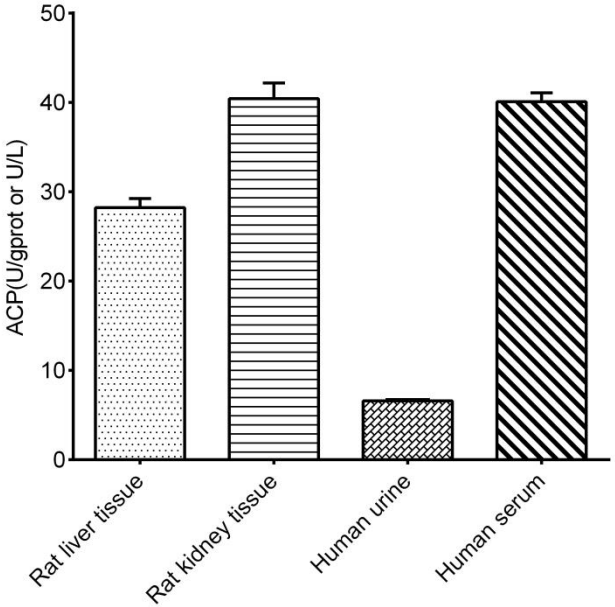
附录2 实例分析

例如检测大鼠肾脏组织(数据仅供参考)：

取稀释20倍的10%大鼠肾脏组织匀浆样本，按操作表操作，结果如下：标准曲线：y = 2.1298 x + 0.0025，样本对照孔平均OD值为0.06，样本测定孔平均OD值为0.470，10%大鼠肾脏组织匀浆蛋白浓度为9.47 gprot/L计算结果为：

$$\text{ACP 活性 (U/gprot)} = (0.470 - 0.06 - 0.0025) \div 2.1298 \div 10 \div 9.47 \times 20 \times 1000 = 40.4 \text{ U/gprot}$$

按照说明书操作，测定大鼠肝脏组织(10%匀浆蛋白浓度为12.22 gprot/L，稀释20倍)、大鼠肾脏组织(10%匀浆蛋白浓度为9.47 gprot/L，稀释20倍)、人尿液和人血清(稀释10倍)中ACP活力(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值 复孔差大	样本浓度低或者稀释倍数较大	增加上样量或重新匀浆提高匀浆浓度
	样本保存不当	处理新鲜样本，重新检测
	试剂二工作液失效	重新配制试剂二工作液，在有效期内检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Yuni Hong, Yun-Hyeok Choi, Young-Eun Han, et al. Central Administration of Ampelopsin A Isolated from Vitis vinifera Ameliorates Cognitive and Memory Function in a Scopolamine-Induced Dementia Model[J]. Antioxidants-Basel. 2021 Jun; 10(6):835. IF:6.312
2. Li Q, R Cebrián, M Montalbán-López, et al. Outer-membrane-acting peptides and lipid II-targeting antibiotics cooperatively kill Gram-negative pathogens[J]. Communications Biology, 2021, 4(1). IF:6.268
3. Naseh A, Shirin B, Maryam M,et al.Attenuation of chronic arsenic neurotoxicity via melatonin in male offspring of maternal rats exposed to arsenic during conception: Involvement of oxidative DNA damage and inflammatory signaling cascades[J]. Life Sciences 266 (2021) 118876. IF:5.037
4. Baek S Y, Li F Y, Kim D H, et al. Enteromorpha prolifera extract improves memory in scopolamine-treated mice via downregulating amyloid-β expression and upregulating BDNF/TrkB pathway[J]. Antioxidants, 2020, 9(7): 620. IF:5.014
5. Aydinoglu F, Ad?belli E?, Y?lmaz-Oral D, Ogulener N. Involvement of RhoA/Rho-kinase in l-cysteine/H2S pathway-induced inhibition of agonist-mediated corpus cavernosal smooth muscle contraction. Nitric Oxide. 2019;85:54 鈥?60. IF:3.371
6. Cui Y, Wang Y, Liu G. Protective Effect of Barbaloin in a Rat Model of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Through the Regulation of the CNPY2?PERK Pathway[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2019. IF:2.928
7. Altaf S, Muhammad F, Aslam B, et al. Cell membrane enveloped polymeric nanosponge for detoxification of chlorpyrifos poison: In vitro and in vivo studies[J]. Human & Experimental Toxicology, 2021, 40(8):1286-1295. IF:2.903
8. Song Q Q, NIN J P, Zhang S Y, et al. Effects of Simulated Heat Wave and Ozone on High Fat Diet ApoE Deficient Mice[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2018, 31(10): 757-768. IF:2.518
9. Wang L, Yang Y, Cui Q, et al. Evaluating the added predictive ability of MMP-9 in serum for Kawasaki disease with coronary artery lesions[J]. Journal of Investigative Medicine, 2020. IF:2.304
10. Yilmaz-Oral D, Kaya-Sezginer E, Oztekin C V, et al. Evaluation of combined therapeutic effects of hydrogen sulfide donor sodium hydrogen sulfide and phosphodiesterase type-5

inhibitor tadalafil on erectile dysfunction in a partially bladder outlet obstructed rat model[J]. Neurourology and Urodynamics, 2020, 39(4): 1087-1097. IF:2.037

11. Yilmaz E, Kaya-Sezginer E, Yilmaz-Oral D, et al. Effects of Hydrogen Sulphide Donor, Sodium Hydrosulphide Treatment on the Erectile Dysfunction in L-NAME-induced Hypertensive Rats[J]. Andrologia, 2019. IF:1.84
12. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. J Adv Res. 2022.