

抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)检测试剂盒(PNP 微板法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介：

酸性磷酸酶(acidphosphatase, ACP)分布极广泛，遍布各种组织，主要存在于细胞的溶酶体内，所以常作为溶酶体标志酶。溶酶体外的酸性磷酸酶存在于内质网和胞质内，各种动物中的酸性磷酸酶各有不同，酸性磷酸酶的适宜 pH 值为 4.5~5.5；存在于正常人肺泡巨噬细胞和白血病人脾脏的抗酒石酸酸性磷酸酶(Tartrate-resistntacidphosphatase, TRAP)均在细胞滤泡中，并不是释放入血液，血液中的 TRAP 绝大多数来源于破骨细胞，因此可以通过测量血液中的 TRAP 了解破骨细胞的功能状态，几乎被认为是机体破骨活性的唯一血液指标，TRAP 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(TRAP)检测试剂盒(PNP 微板法)(Tartrate Resistnt Acid Phosphatase Colorimetric Assay Kit)检测原理是利用 p-nitrophenyl phosphate (pNPP)为一种常用的磷酸酶显色底物，在酸性条件下可在 ACP 的作用下生成 p-nitrophenol (p-NP)；在碱性条件下 p-NP 呈黄色，黄色越深说明 ACP 活性越高，反之则酶活性越低，在 400~415nm 处有最大吸收；在适量的酒石酸存在的情况下进行 ACP 活性检测，得到的 ACP 活性就是 TRAP 的活性，根据 p-NP 的生成量即可计算出 TRAP 的活性水平，可用于检测细胞或组织的裂解液或匀浆液、血浆、血清、尿液等样品中内源性的 TRAP 活性。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

名称	规格	保存条件
抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)检测试剂盒	120T	4℃
试剂(A):ACPAssayBuffer	15ml	4℃
试剂(B):pNPP	2 支	-20℃避光
试剂(C):TartrateSolution	1ml	4℃
试剂(D):p-nitrophenol(10mM)	0.1ml	-20℃避光
试剂(E):StoppingSolution	20ml	RT
使用说明书	1 份	
有效期	1 年	

自备材料：

- 1、PBS 或生理盐水

- 2、离心管
- 3、水浴锅或恒温箱
- 4、96 孔板、酶标仪

操作步骤(仅供参考):

1、准备样品:

- ①血浆、血清和尿液样品: 血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于该试剂盒的测定, 尿液通常也可以直接用于测定, -20°C 冻存, 用于 TRAP 的检测。
- ②细胞或组织样品: 取恰当细胞或组织裂解液, 如果有必要可用 PBS 或生理盐水进行适当匀浆, 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, -20°C 冻存, 用于 TRAP 的检测。
- ③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°C 冻存, 用于 TRAP 的检测。
- ④高活性样品: 如果样品中含有较高活性的 TRAP, 可以使用 ACPAssayBuffer、PBS 或生理盐水稀释后再行检测。

2、配制显色工作液: 取出 1 支 pNPP, 恢复至室温后溶解于 2.5ml ACPAssayBuffer, 混匀, 冰上预冷备用, 新配制的显色工作液应在 6h 内用完。

3、配制系列标准品: 取出 p-nitrophenol(10mM)恢复至室温, 按 p-nitrophenol(10mM): ACPAssayBuffer=1: 19 的比例混合, 使浓度达到 0.5mM, -20°C 冻存备用; 按下表继续稀释:

加入物(ml)	1	2	3	4	5	6
p-nitrophenol(0.5mM)	4	8	16	24	32	40
ACPAssayBuffer	36	32	24	16	8	0
p-nitrophenol 含量(μM /0.3ml)	0.002	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02

4、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测定, 样品的检测最好能设置平行孔。

加入物(μl)	空白孔	标准孔	测定孔
ACPAssayBuffer	4	—	—
系列标准品(1~6 号)	—	4	—
待测样品	—	—	4
显色工作液	40	40	40
TartrateSolution	5	5	5

5、TRAP 测定: 轻轻混匀, 37℃ 孵育 25~30min, 每孔加入 160 μ l Stopping Solution 终止反应; 以空白调零, 酶标仪测定 405nm 处标准管、测定管的吸光度。

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 μ M 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 4.837℃ 条件下, 每分钟水解 pNPP 显色底物产生 1 μ M 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。

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

注意事项:

- 1、待测样品中不能含有磷酸酶抑制剂, 同时需避免反复冻融。
- 2、如果待测样品体积较少, 可减少样品加样量, 以 ACP Assay Buffer 补至 30 μ l。
- 3、如果无法检测 405nm, 亦可检测 400~415nm 范围内吸光度。
- 4、建议每次测定时都最好作标准曲线, 以使标准更准确, 另外标准品避免反复冻融。
- 5、如果没有酶标仪, 也可以使用普通的分光光度计测定, 但应考虑根据比色杯的最小检测体积, 尽量采用小体积的比色杯。
- 6、所测样品的含量高于标准曲线的上限, 应用 ACP Assay Buffer 稀释样品后重新测定。
- 7、配制 1 支显色工作液后应当日用完, 因此请注意适当多准备一些样品一起检测。
- 8、p-nitrophenol 溶液对人体有害, 反应终止液有腐蚀性, 请小心操作。
- 9、如果希望进行酶活性的绝对定量, 进行酶反应时应精确计时, 此时推荐采用孵育 30min 或更长时间, 以减小操作过程中的时间误差。
- 10、待测样品中抗酒石酸酸性磷酸酶活性较低时, 可适当延长孵育时间至 30min。