

抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC17863

规格：100T/48S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 4mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂三	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂四	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂五	液体 0.3mL×1 支	2-8℃保存
试剂六	液体 1.2mL×1 支	2-8℃保存
试剂七	液体 1.2mL×1 支	2-8℃保存
试剂八	液体 15mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 1.2mL 试剂一，充分溶解，如果试剂溶解不充分，可将试剂加热至 50℃促进溶解。未用完的试剂 2-8℃保存可以保存 8 周。
- 2、试剂三：临用前加入 1mL 蒸馏水，充分溶解，未用完的试剂-20℃保存可以保存 4 周，避免反复冻融。一支试剂溶解后可以做 100T，为了延长试剂盒使用时间，因此多给一支粉剂。
- 3、试剂四：临用前加入 5.5mL 蒸馏水溶解，未用完的试剂 2-8℃保存可以保存 4 周。
- 4、试剂五：临用前根据样本量按照试剂五：蒸馏水=1:9 的比例配制，现用现配。
- 5、标准品：5μmol/mL 酚标准液。临用前取 100μL 的 5μmol/mL 酚标准液于 EP 管中，加入 300μL 蒸馏水充分溶解，配制成 1.25 μmol/mL 的酚标准液。

产品说明：

抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）是破骨细胞的特征性酶，TRAP 参与骨基质中固体钙磷矿化底物的降解，其表达和分泌与破骨细胞功能密切相关。

在酒石酸存在的情况下，抗酒石酸酸性磷酸酶的活性不被抑制，而其他的酸性磷酸酶的活性则会受到抑制。酸性条件下，抗酒石酸酸性磷酸酶催化 PNPP 生成对硝基苯酚。对硝基苯酚在碱性条件下呈黄色，可以在 400nm 波长下检测吸光度。产物黄色越深，说明抗酒石酸酸性磷酸酶活性越高，反之则酶活性越低。



需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器/超声破碎仪、蒸馏水和冰。

操作步骤:

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 1、组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 2、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。。
- 3、液体：直接测定。（若溶液呈现浑浊，则离心取上清后再测定）。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 400nm，可见分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、操作表：（在 96 孔板或者 EP 管中加入下列试剂）

试剂名称（μL）	测定管	对照管	标准管	标准空白管
样本	10	10	-	-
标准品	-	-	10	-
蒸馏水	-	10	-	10
试剂一	10	10	10	10
试剂二	10	10	10	10
试剂三	10	-	10	10
试剂四	10	10	10	10
试剂五	10	10	10	10
试剂六	10	10	10	10
试剂七	10	10	10	10
	37℃避光反应 1 小时		-	-
试剂八	120	120	120	120

混匀后，测定在 400nm 处的吸光度，记作 A_{测定}，A_{对照}，A_{标准}，A_{标准空白}。ΔA_{测定}=A_{测定}-A_{对照}，ΔA_{标准}=A_{标准}-A_{标准空白}。（标准管和标准空白管只需做 1-2 次。）

三、TRAP 活性计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟催化产生1nmol酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{TRAP 活性 (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

(2) 按样本质量计算

单位的定义：每g组织每分钟催化产生1nmol酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{TRAP 活性 (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$$

(3) 按细菌或细胞数目计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞每分钟催化产生1nmol酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{TRAP 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (N \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N \times F$$

(4) 按血清（浆）等液体体积计算

单位的定义：每mL血清（浆）等液体每分钟催化产生1nmol酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{TRAP活性 (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10^3 \times F = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

C_{标准}: 酚标准液, 1.25 μmol/mL ; V_样: 反应体系中加入的样本体积, 0.01mL; V_{样总}: 加入的提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 60min; C_{pr}: 蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌数目, 500万; 10³: 单位换算系数, 1μmol/mL=10³nmol/mL; N: 细胞或细菌数量, 以万计; F: 样本稀释倍数。

注意事项:

1、 如果测定的吸光值或ΔA_{测定}大于 1.5, 可以对样本用蒸馏水进行稀释或者缩短 37°C酶促反应时间; ΔA_{测定}小于 0.01, 可以加大样本量或者延长 37°C酶促反应时间。最终计算时同步修改计算公式。

实验实例:

1、 称取 0.1057g 兔子肾脏组织, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算Δ_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=0.824-0.096=0.728, Δ_{标准}=A_{标准}-A_{标准空白}=0.820-0.065=0.755, 带入公式计算:

$$\text{TRAP活性 (U/g 质量)} = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 190.02 \text{ U/g 质量}$$

2、 称取 0.1000g 竹子叶, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 将上清稀释 4 倍按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算Δ_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=0.900-0.089=0.811, Δ_{标准}=A_{标准}-A_{标准空白}=0.820-0.065=0.755, 带入公式计算:

$$\text{TRAP活性 (U/g 质量)} = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 895.0 \text{ U/g 质量}$$

3、 吸取 0.01mL 人血清, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算Δ_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=0.181-0.161=0.020, Δ_{标准}=A_{标准}-A_{标准空白}=0.820-0.065=0.755, 带入公式计算:

$$\text{TRAP活性 (U/mL)} = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F = 0.552 \text{ U/mL}$$

参考文献:

[1] Megat R, Wahab A, Dasor M M, et al. Crevicular tartrate resistant acid phosphatase activity and rate of tooth movement under different continuous force applications[J]. African journal of pharmacy and pharmacology, 2011, 5(20):2213-2219.

[2] Natas`a Mitić, Mohsen Valizadeh, Eleanor W.W. Leung, et al. Human tartrate-resistant acid phosphatase becomes an effective ATPase upon proteolytic activation [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics 439 (2005) 154–164.

相关系列产品:

AC10390/AC10391 组织及血液碱性磷酸酶（AKP/ALP）活性检测试剂盒

AC10388/AC10389 组织及血液酸性磷酸酶（ACP）活性检测试剂盒