

抗氟离子酸性磷酸酶 (FRAP) 活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC5455

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, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8°C 保存
试剂一	液体 1.5mL×1 支	2-8°C 保存
试剂二	液体 1.2mL×1 支	2-8°C 保存
试剂三	粉剂×2 支	-20°C 保存
试剂四	粉剂×1 瓶	2-8°C 保存
试剂五	液体 0.3mL×1 支	2-8°C 保存
试剂六	液体 1.2mL×1 支	2-8°C 保存
试剂七	液体 1.2mL×1 支	2-8°C 保存
试剂八	液体 15mL×1 瓶	2-8°C 保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8°C 保存

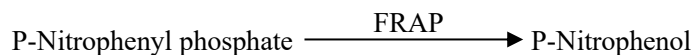
溶液的配制:

- 1、试剂三: 临用前加入 1mL 蒸馏水, 充分溶解, 未用完的试剂-20°C 保存可以保存 4 周, 避免反复冻融。一支试剂溶解后可以 100T, 为了延长试剂盒使用时间, 因此多给一支粉剂。
- 2、试剂四: 临用前加入 5.5mL 蒸馏水, 充分溶解, 未用完的试剂 2-8°C 保存可以保存 4 周。
- 3、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。
- 4、标准品: 5 μ mol/mL 酚标准液。临用前取 100 μ L 的 5 μ mol/mL 酚标准液于 EP 管中, 加入 300 μ L 蒸馏水充分溶解, 配制成 1.25 μ mol/mL 的酚标准液。

产品说明:

抗氟离子酸性磷酸酶(fluid resistant acid phosphatase, FRAP)是酸性磷酸酶的一种。抗氟离子酸性磷酸酶主要分布于在绝大多数细胞的溶酶体中、前列腺(prostate gland)、脑、肝脏、脾脏和血小板。

抗氟离子酸性磷酸酶的活性不被氟离子抑制, 而其他的酸性磷酸酶的活性则会受到氟离子的抑制。酸性条件下, 抗氟离子酸性磷酸酶催化 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, 说明抗氟离子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、分析天平、水浴锅/恒温培养箱、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：

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 30min		-	-
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、FRAP 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。

$$\text{FRAP 活性 (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 41.67 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

(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。

$$\text{FRAP 活性 (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 41.67 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$$

(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。

$$\text{FRAP 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div (N \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^3 \times F = 41.67 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

(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。

$$\text{FRAP 活性 (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10^3 \times F = 41.67 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

$C_{标准}$: 酚标准液, 1.25 $\mu\text{mol/mL}$; $V_{样}$: 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, 30min; Cpr: 蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 10^3 : 单位换算系数, $1\mu\text{mol/mL}=10^3\text{nmol/mL}$;
N: 细胞数量, 以万计; F: 样本稀释倍数。

注意事项:

1、如果测定的吸光值或 $\Delta A_{测定}$ 大于 1.5, 可以对样本进行稀释或者缩短 37°C酶促反应时间; 测定的吸光值或 $\Delta A_{测定}$ 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 0.1074g 兔子肝脏组织, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 将上清液稀释 2 倍后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=0.485-0.067=0.418$, $\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{标准空白}=0.720-0.070=0.650$, 带入公式计算:

FRAP活性 (U/g 质量) = $41.67 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W \times F = 499.013 \text{ U/g 质量}$

2、称取 0.1057g 竹子叶, 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 $\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=0.396-0.110=0.286$, $\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{标准空白}=0.720-0.070=0.650$, 带入公式计算:

FRAP活性 (U/g 质量) = $41.67 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W \times F = 173.461 \text{ U/g 质量}$

3、吸取 0.01mL 羊血清, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=0.126-0.070=0.056$, $\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{标准空白}=0.720-0.070=0.650$, 带入公式计算:

FRAP活性 (U/mL) = $41.67 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times F = 3.590 \text{ U/mL}$

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 Mitic', 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:

- BC2140/BC2145 组织及血液碱性磷酸酶 (AKP/ALP) 活性检测试剂盒
- BC2130/BC2135 组织及血液酸性磷酸酶 (ACP) 活性检测试剂盒
- BC5400/BC5405 抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 活性检测试剂盒

