



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)检测试剂盒(PNP 比色法)

简介:

酸性磷酸酶(acid phosphatase, 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-resistnt acid phosphatase, 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。

源叶生物 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)检测试剂盒(PNP 比色法)(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。

组成:

名称 \ 编号	编号	R21802	Storage
		60T	
试剂(A): ACP Assay Buffer		50ml	4℃
试剂(B): pNPP		2 支	-20℃ 避光



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

试剂(C): Tartrate Solution	2ml	4℃
试剂(D): <i>p</i> -nitrophenol(10mM)	0.4ml	-20℃ 避光
试剂(E): Stopping Solution	80ml	RT
使用说明书	1 份	

自备材料:

- 1、PBS 或生理盐水
- 2、离心机、离心管、水浴锅或恒温箱、石英比色杯、分光光度计

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℃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℃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℃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 ACP Assay Buffer、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 9ml ACP Assay Buffer, 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, 离心机 10000rpm 离心 5min, 按 *p*-nitrophenol(10mM): ACP Assay Buffer=1: 19 的比例混合, 使浓度达到 0.5mM, -20℃冻存储备用, 按下表继续稀释:



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

加入物(ml)	1	2	3	4	5	6
<i>p</i> -nitrophenol(0.5mM)	0.03	0.06	0.12	0.18	0.24	0.3
ACP Assay Buffer	0.27	0.24	0.18	0.12	0.06	0
<i>p</i> -nitrophenol 含量(μ M/0.3ml)	0.015	0.03	0.06	0.09	0.12	0.15

4、TRAP 加样: 按照下表设置空白管、标准管、空白管, 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管。

加入物(ml)	空白管	标准管	测定管
ACP Assay Buffer	0.3	—	—
系列标准品(1~6 号)	—	0.3	—
待测样品	—	—	0.3
显色工作液	0.3	0.3	0.3
Tartrate Solution	0.03	0.03	0.03

5、TRAP 测定: 轻轻混匀, 37℃ 孵育 25~30min, 每管加入 1.2ml Stopping Solution 终止反应, 以空白调零, 比色杯光径 1cm, 分光光度计测定 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)0.015、0.03、0.06、0.09、0.12、0.15 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 4.8 37℃ 条件下, 每分钟水解 *p*NPP 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。

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

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。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

- 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 0.3ml。
- 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、如果没有分光光度计，也可用普通的酶标仪测定，但应考虑根据 96 孔板最大检测体积。
- 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。

有效期： 12 个月有效；4℃运输，-20℃保存。