

抗氟离子酸性磷酸酶 (FRAP) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA2160

产品规格: 100T/48S

产品简介:

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。



产品组成:

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

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℃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。
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℃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: 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1.25μmol/mL的酚标准液。

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



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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°C 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 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°C 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 $A_{\text{测定}}$, $A_{\text{对照}}$, $A_{\text{标准}}$, $A_{\text{标准空白}}$ 。 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{标准空白}}$ 。
(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。

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

$C_{\text{标准}}$: 酚标准液, 1.25 μmol/mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入的样本体积, 0.01mL; $V_{\text{样总}}$: 加入的提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 30min; C_{pr} : 蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 10^3 : 单位换算系数, 1 μmol/mL = 10^3 nmol/mL; N : 细胞或细菌数量, 以万计; F : 样本稀释倍数。

注意事项:

如果测定的吸光值或 $\Delta A_{\text{测定}}$ 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; 测定的吸光值或 $\Delta A_{\text{测定}}$ 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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com