

中性磷酸酶（Neutral phosphatase, NP）活性测定说明书

（货号：ADS-F-ZM005 分光法 48 样）

一、产品简介：

磷酸酶是一种重要的水解酶。中性磷酸酶（NP，EC 3.1.3.2）在中性条件下磷酸酯去磷酸化。本试剂盒提供一种高灵敏度，简单，直接的检测方法，使用磷酸对硝基苯酯（pNPP）作为底物，生成黄色的产物 PNP，该产物在 405nm 处有最大吸收峰。通过检测 PNP 在 405nm 下的增加速率，即可得到中性磷酸酶（NP）活性的大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉剂 2 瓶	4℃避光保存	每瓶临用前甩几下使粉体落入底部，再加 2.2mL 试剂一溶解，现配现用，一周内用完。
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃避光保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、水浴锅、可调式移液器

四、中性磷酸酶（NP）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

- ① 组织样本：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，4℃×12000rpm 离心 15min，取上清液待测。

【注】：①若增加样本量，也可以按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例提取。

②样本制备，当天准备当天测定。且样本中应避免酒石酸盐，氟化物，EDTA，草酸盐和柠檬酸盐等物质，因其对中性磷酸酶的活性有抑制作用。

- ② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 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）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本：可直接测定，或者适当稀释后测定。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 30 min，设置温度 37℃，调节波长为 405nm，蒸馏水调零。
② 所有试剂于 37℃水浴中预热 30 min。
③ 在 EP 管中或 1mL 玻璃比色皿中依次加入下列试剂：

试剂名称（μL）	测定管	空白管 （只做一次）
样本	40	
试剂一	560	600
试剂二	80	80
混匀，避光反应，37℃水浴或恒温培养箱孵育 20min		

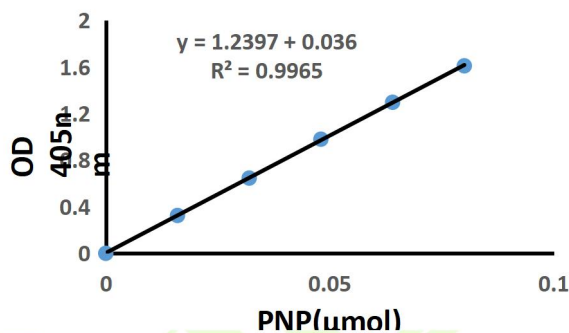
试剂三	120	120
混匀，在 37℃ 下静置 5min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿，立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】：① 最后一步检测时，若有结晶析出，需要 37℃ 复溶再读取吸光值。

- ② 若 ΔA 的值非常低在零附近，可增加样本量 V1（如增至 80μL，则试剂一相应减少）或延长反应时间 T（如增至 30min 或更长），则重新调整的 V1 和 T 须代入公式重新计算。
- ③ 若 ΔA 的值超过 1，则需要稀释样本，稀释倍数 D 代入计算公式；
- ④ 若样本上清液颜色较深且偏黄色可增加样本自身对照管消除背景色造成的影响，对照管为：40μL 样本 + 560μL 试剂一 + 80μL 蒸馏水，37℃ 水浴或恒温培养箱孵育 20min 后，再加 120μL 试剂三，37℃ 下静置 5min 后于 405nm 读值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。提醒：若设定对照管，则可检测的样本数量会相应减少，由 48 样减少为 24 样。

五、结果计算：

1、标准曲线：y = 1.2397x + 0.036，x 是 PNP 摩尔质量：μmol；y 是 ΔA 。



2、按照样本质量计算：

酶活定义：在 37℃ 下，每克组织每分钟水解 1μmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{NP } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.036) \div 1.2397] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 1.008 \times (\Delta A - 0.036) \div W \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算：

酶活定义：在 37℃ 下，每毫克蛋白每分钟水解 1μmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{NP } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A - 0.036) \div 1.2397] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 1.008 \times (\Delta A - 0.036) \div Cpr \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：在 37℃ 下，每 10⁴ 个细胞每分钟水解 1nmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{NP } (\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.036) \div 1.2397] \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 2.0166 \times (\Delta A - 0.036) \times D$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：在 37℃ 下，每毫升液体每分钟水解 1μmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{NP 活力 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A - 0.036) \div 1.2397] \div V1 \div T = 1.008 \times (\Delta A - 0.036)$$

W---样品质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---上清液体积（mL），0.04mL；

T---反应时间，20 min。

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

500---细胞数量，万；

Cpr---上清液蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（10μmol/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解，若有结晶析出，需 37℃ 水浴至完全溶解。

- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。

