

## 中性磷酸酶（Neutral phosphatase, NP）活性测定说明书

（货号：BP10177F 分光法 48 样 有效期：6 个月）

### 一、指标介绍：

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：

| 试剂组分 | 试剂规格        | 存放温度   | 注意事项                                                             |
|------|-------------|--------|------------------------------------------------------------------|
| 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：<br>1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 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 | 1. 若重新做标曲，则用到该试剂；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>3. 溶解后的标品一周内用完。     |

### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本提取：

- 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样本提取，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（10<sup>4</sup>）：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、检测步骤：

- ① 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：

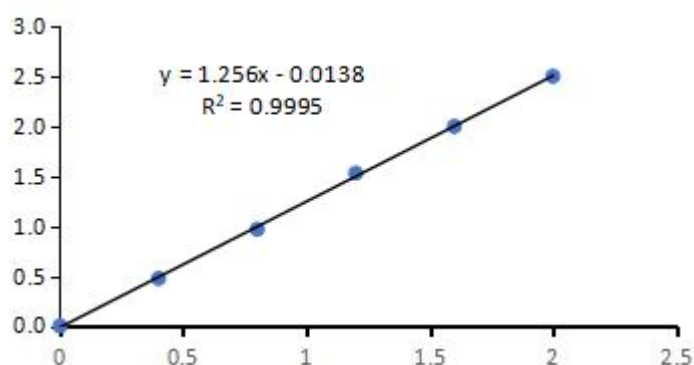
| 试剂组分 (μL)                                                                                               | 测定管 | 空白管<br>(只做一次) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------|
| 样本                                                                                                      | 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，<br>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  $\Delta A$  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  $\Delta A$  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 = 1.256x - 0.0138，x 是 PNP 摩尔浓度：μmol/mL；y 是  $\Delta A$ 。



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。

$$\begin{aligned} \text{NP} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0138) \div 1.256] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 0.995 \times (\Delta A + 0.0138) \div W \times D \end{aligned}$$

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。

$$\text{NP} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0138) \div 1.256] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 0.995 \times (\Delta A + 0.0138) \div Cpr \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：在 37℃下，每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟水解 1nmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{NP} (\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0138) \div 1.256] \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 1.99 \times (\Delta A + 0.0138) \times D \end{aligned}$$

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。

$$\text{NP 活力} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0138) \div 1.256] \div V1 \div T = 0.995 \times (\Delta A + 0.0138)$$

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 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°C 水浴至完全溶解，标准品母液浓度为 10 $\mu$ mol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2  $\mu$ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

|                                                          |     |     |     |     |     |     |
|----------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 吸取标准品母液 200uL，加入 800uL 蒸馏水，混匀得到 2 $\mu$ mol/ml 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
| 标品浓度<br>$\mu$ mol/mL                                     | 0   | 0.4 | 0.8 | 1.2 | 1.6 | 2   |
| 标品稀释液<br>uL                                              | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL                                                     | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |
| 各标准管混匀待用。                                                |     |     |     |     |     |     |

- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

|                                                                                   |     |              |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------|
| 试剂名称 ( $\mu$ L)                                                                   | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
| 标品                                                                                | 40  |              |
| 蒸馏水                                                                               |     | 40           |
| 试剂一                                                                               | 560 | 560          |
| 试剂二                                                                               | 80  | 80           |
| 混匀，避光反应，37°C 水浴或恒温培养箱孵育 20min                                                     |     |              |
| 试剂三                                                                               | 120 | 120          |
| 混匀，在 37°C 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， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。 |     |              |