

碱性磷酸酶（AKP/ALP）活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/48S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

AKP/ALP 是一种含锌的糖蛋白酶，在碱性环境中可水解各种天然及人工合成的磷脂单酯化合物。AKP/ALP 广泛分布于人体各脏器中，以肝脏为主。

测定原理：

在碱性环境中，AKP/ALP 催化磷酸苯二钠生成游离酚；酚与 4-氨基安替比林和铁氰化钾反应红色亚醌衍生物，在 510nm 有特征光吸收；通过测定 510 nm 吸光度增加速率，来计算 AKP 活性。

自备仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂三：液体×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂四：液体×1 瓶，4℃ 避光保存，未变成蓝绿色之前均可使用。

标准品：液体×1 支（EP 管中），2 μmol/mL 酚标准液，4℃ 保存。

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆，4℃、8000g 离心 10min，取上清液待测。
2. 细菌或细胞：按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血液可直接测定，或者适当稀释后测定。

测定步骤：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长到 510 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂三置于 37℃ 水浴中预热 30 min。
3. **空白管：**取 EP 管，加入 4μL 蒸馏水，40μL 试剂二，40μL 试剂三，混匀后置于 37℃ 水浴中保温 15min；加入试剂四 120μL，混匀后于 510nm 测定吸光度，记为 A 空白管。
4. **标准管：**取 EP 管，加入 4μL 标准品，40μL 试剂二，40μL 试剂三，混匀后置于 37℃ 水浴中保温 15min；加入试剂四 120μL，混匀后于 510nm 测定吸光度，记为 A 标准管。
5. **对照管：**取 EP 管，加入 4μL 上清液，40μL 蒸馏水，40μL 试剂三，混匀后置于 37℃ 水浴中保温 15min；加入试剂四 120μL，混匀后于 510nm 测定吸光度，记为 A 测定管。
6. **测定管：**取 EP 管，加入 4μL 上清液，40μL 试剂二，40μL 试剂三，混匀后置于 37℃ 水浴中保温 15min；

加入试剂四 120 μ L，混匀后于 510nm 测定吸光度，记为 A 测定管。

其中标准管和空白管只需做一管，测定管和对照管每个样均需做。

注意：空白管和标准管只需测定一次。

AKP/ALP 活性计算：

1. 血液中 AKP/ALP 活力计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C 中每毫升血液每分钟催化产生 1 μ mol 酚定义为 1 个酶活单位。

AKP/ALP 活力(μ mol/min /mL)=[C 标准品 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \times V 反总] \div V 样
 \div T=6.8 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管)

2. 组织、细菌或细胞中 AKP/ALP 活性计算

(1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C 中每毫克蛋白每分钟催化产生 1 μ mol 酚定义为 1 个酶活单位。

AKP/ALP(μ mol/min/mg prot)=[C 标准品 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \times V 反总] \div (Cpr \times V 样) \div T=6.8 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div Cpr

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C 中每克组织每分钟催化产生 1 μ mol 酚定义为 1 个酶活单位。

AKP/ALP(μ mol/min/g 鲜重)=[C 标准品 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \times V 反总] \div (W \times V 样 \div V 样总) \div T=6.8 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div W

(3) 按照细菌或细胞数量计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C 中每 10⁴ 个细菌或细胞每分钟催化产生 1 μ mol 酚定义为 1 个酶活单位。AKP/ALP (μ mol/min/10⁴ cell)=[C 标准品 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \times V 反总] \div (细胞数量 \times V 样 \div V 样总) \div T= 6.8 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div 细胞数量

C 标准品：2 μ mol/mL；V 反总：反应体系总体积 (mL)，205 μ L=0.205mL； Cpr：粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL)，需要另外测定，建议使用本公司生产的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒；W：样品质量；V 样：加入反应体系中上清液体积 (mL)，0.004mL；V 样总：提取液体积，1 mL；T：反应时间 (min)，15 min。

注意事项：

1. 试剂二、试剂三和试剂四均需避光保存。
2. 试剂四变蓝绿色后不能再使用。
3. 加入试剂四后必须立即混匀，否则显色不完全。