

## 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<sup>4</sup>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；加入试剂四120μL，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°C中每毫升血液每分钟催化产生1 $\mu$ mol酚定义为1个酶活单位。

AKP/ALP活力( $\mu$ 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°C中每毫克蛋白每分钟催化产生1 $\mu$ mol酚定义为1个酶活单位。

AKP/ALP( $\mu$ 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°C中每克组织每分钟催化产生1 $\mu$ mol酚定义为1个酶活单位。

AKP/ALP( $\mu$ 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°C中每104个细菌或细胞每分钟催化产生1 $\mu$ mol酚定义为1个酶活单位。AKP/ALP ( $\mu$ 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 $\mu$ mol/mL； V反总：反应体系总体积（mL），205 $\mu$ 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。