

碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP/ALP) 活性测定试剂盒

说明书

分光光度法 50 管/24 样

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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

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 (10⁴ 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 20μL 蒸馏水，200μL 试剂二，200μL 试剂三，混匀后置于 37℃ 水浴中保温 15min；加入试剂四 600μL，混匀后于 510 nm 测定吸光度，记为 A 空白管。
4. 标准管：取 EP 管，加入 20μL 标准品，200μL 试剂二，200μL 试剂三，混匀后置于 37℃ 水浴中保温 15min；加入试剂四 600μL，混匀后于 510 nm 测定吸光度，记为 A 标准管。
5. 对照管：取 EP 管，加入 20μL 上清液，200μL 蒸馏水，200μL 试剂三，混匀后置于 37℃ 水浴中保温 15min；加入试剂四 600μL，混匀后于 510 nm 测定吸光度，记为 A 测定管。
6. 测定管：取 EP 管，加入 20μL 上清液，200μL 试剂二，200μL 试剂三，混匀后置于 37℃ 水浴中保温 15min；加入试剂四 600μL，混匀后于 510 nm 测定吸光度，记为 A 测定管。

注意：空白管和标准管只需测定一次。每个测定管设一个对照管。

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 μmol 酚定义为 1 个酶活单位。

AKP/ALP 活力(μmol/min /mL)= [C 标准品×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)×V 反总] ÷V 样 ÷T=6.8×(A 测定管-A 对照管)÷(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 μmol 酚定义为 1 个酶活单位。

AKP/ALP(μmol/min/mg prot)=[C 标准品×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)×V 反总]÷(Cpr×V 样)÷T=6.8×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管) ÷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 μmol 酚定义为 1 个酶活单位。

AKP/ALP(μmol/min/g 鲜重)=[C 标准品×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)×V 反总]÷(W×V 样÷V 样总)÷T=6.8×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管) ÷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 μmol 酚定义为 1 个酶活单位。AKP/ALP (μmol/min/10⁴ cell)= [C 标准品×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)×V 反总]÷(细胞数量×V 样÷V 样总)÷T= 6.8×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管) ÷细胞数量

C 标准品: 2 μmol/mL; V 反总: 反应体系总体积 (mL), 1020 μL=1.02 mL; V 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), 0.020 mL; V 样总: 加入提取液体积, 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。