

## 碱性磷酸酶（AKP/ALP）活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/48S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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。

### 组成：

产品名称	ES008-100T/48S	Storage
试剂一：液体	1 瓶	4°C
试剂二：液体	1 瓶	4°C避光
试剂三：液体	1 瓶	4°C避光
试剂四：液体	1 瓶	4°C避光
标准品：液体	1 支	4°C
说明书	一份	

试剂四：液体×1 瓶，4°C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°C保存。

### 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。

### 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°C、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°C，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。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



## 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°C 水浴中预热 30 min。
  3. **空白管**: 取 EP 管, 加入 4 $\mu$ l 蒸馏水, 40 $\mu$ l 试剂二, 40 $\mu$ l 试剂三, 混匀后置于 37°C 水浴中保温 15min; 加入试剂四 120 $\mu$ l, 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 4 $\mu$ l 标准品, 40 $\mu$ l 试剂二, 40 $\mu$ l 试剂三, 混匀后置于 37°C 水浴中保温 15min; 加入试剂四 120 $\mu$ l, 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 4 $\mu$ l 上清液, 40 $\mu$ l 蒸馏水, 40 $\mu$ l 试剂三, 混匀后置于 37°C 水浴中保温 15min; 加入试剂四 120 $\mu$ l, 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 4 $\mu$ l 上清液, 40 $\mu$ l 试剂二, 40 $\mu$ l 试剂三, 混匀后置于 37°C 水浴中保温 15min; 加入试剂四 120 $\mu$ 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°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 10<sup>4</sup> 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/10<sup>4</sup> 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。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利

