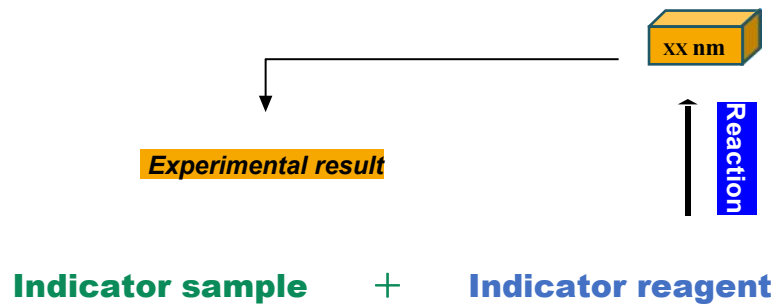


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

组织及血液碱性磷酸酶（AKP/ALP）活性测定试剂盒说明书 可见分光光度法

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。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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）	4℃保存	2 μ mol/mL 酚标准液

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. 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510nm，蒸馏水调零。
2. 试剂三置于37℃水浴中预热30min。
3. 空白管：取EP管，加入20 μL蒸馏水，200 μL试剂二，200 μL试剂三，混匀后置于37℃水浴中保温15min；加入试剂四600 μL，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20 μL标准品，200 μL试剂二，200 μL试剂三，混匀后置于37℃水浴中保温15min；加入试剂四600 μL，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200 μL试剂二，200 μL试剂三，混匀后置于37℃水浴中保温15min；加入试剂四600 μL，混匀；最后加入20 μL上清液，混匀后于510 nm测定吸光度，记为A对照管。

6. 测定管：取EP管，加入20 μL上清液，200 μL试剂二，200 μL试剂三，混匀后置于 37°C水浴中保温 15min；加入试剂四600 μL，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。

AKP/ALP 活性计算：

1. 组织中 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。

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

(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。

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

C 标准品：2 μmol/mL；V 反总：反应体系总体积 (mL)，1020 μL=1.02 mL；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；

V 样：加入反应体系中上清液体积 (mL)，0.020mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；W：样本质量，g；T：反应时间 (min)，15 min。

2. 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。

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

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)，0.020mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；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。