

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0659

Size: 50T/24S

碱性磷酸酶 (AKP/ALP) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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 510nm 吸光度增加速率, 来计算 AKP 活性。

三、需自备的仪器和用品:

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。

四、试剂的组成和配置:

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 μmol/mL 酚标准液

五、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。

六、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510nm 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℃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测定管。

注意：空白管和标准管只需测定一次。

七、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℃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。

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

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：37℃中每克组织每分钟催化产生 1 μmol 酚定义为1个酶活单位。

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

C标准品：2 μmol/mL；V反总：反应体系总体积（mL），1020 μL=1.02mL；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），15min。

2. 血液中 AKP/ALP 活力计算

活性单位定义：37℃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。

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

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。

八、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。