

使用说明书

Instruction Manual

碱性磷酸酶(AKP/ALP)活性检测试剂盒（微量法） Alkaline Phosphatase Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

碱性磷酸酶 (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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/48S 规格的产品组成如下:

组成	规格	储存条件
CB0019M-A	60mL ×1 瓶	4°C保存。
CB0019M-B	5mL ×1 瓶	4°C避光保存。
CB0019M-C	5mL ×1 瓶	4°C避光保存。
CB0019M-D	15mL ×1 支	4°C避光保存,变成蓝绿色不能使用。
CB0019M-Standard	1mL ×1 支	标准品: 2.5μmol/mL 酚标准液, 4°C保存。

注:正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、水浴锅、可调式移液枪、台式离心机、研钵、冰和双蒸水。

二、粗酶液提取:

- 组织:按照组织质量(g):CB0019M-A 体积(mL)为 1:5-10 的比例(建议称取约 0.1g 组织,加入 1mL CB0019M-A)进行冰浴匀浆。10000rpm, 4°C离心 10min,取上清,置冰上待测。
- 血液可直接测定,或者适当稀释后测定。

三、测定步骤:

- 分光光度计预热30 min,调节波长到510 nm,蒸馏水调零;
- CB0019M-B 置于37°C水浴中预热30 min;
- 按列表中顺序加入上述试剂:

试剂名称	空白管 (μL)	标准管 (μL)	对照管 (μL)	测定管 (μL)
上清液				4
标准品		4		
蒸馏水	4			
CB0019M-B	40	40	40	40
CB0019M-C	40	40	40	40
混匀后置于37°C水浴中保温15min。				
CB0019M-D	120	120	120	120
必须立即混匀，否则显色不完全。				
上清液			4	
混匀后于510 nm 测定吸光度。				
	记为：A 空白管。	记为：A 标准管。	记为：A 对照管。	记为：A 测定管。

注：空白管和标准管只需测定 1-2 次。

四、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 1μmol 酚定义为 1 个酶活单位。

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

$$= 6.8 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(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 1μmol 酚定义为 1 个酶活单位。

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

$$= 6.8 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{W}$$

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 1μmol 酚定义为 1 个酶活单位。

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

$$= 6.8 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$$

注：C 标准品：2μmol/mL；V 反总：反应体系总体积(mL)，204 μL=0.204 mL；V 样：加入反应体系中上清液体积 (mL),0.004mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间 (min)，15 min；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白浓度。

注意事项

1. CB0019M-B, CB0019M-C, CB0019M-D 需 4°C避光保存。
2. 若 CB0019M-D 变成蓝绿色，则不能使用。
3. 加入 CB0019M-D 后必须立即混匀，否则显色不完全。
4. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

