

使用说明书

Instruction Manual

碱性磷酸酶(AKP/ALP)活性检测试剂盒（分光光度法）

Alkaline Phosphatase Assay Kit (Spectrophotometry)

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

50T/24S 规格的产品组成如下:

组成	规格	储存条件
CB0019S-A	60mL×1 瓶	4℃保存。
CB0019S-B	10mL×1 瓶	4℃避光保存。
CB0019S-C	10mL×1 瓶	4℃避光保存。
CB0019S-D	30mL×1 支	4℃避光保存, 变成蓝绿色不能使用。
CB0019S-Standard	1mL×1 支	标准品: 2μmol/mL 酚标准液, 4℃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:

紫外分光光度计、1mL 玻璃比色皿、水浴锅、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。

二、粗酶液提取:

- 组织: 按照组织质量 (g): CB0019S-A 体积(mL)为 1: 5-10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL CB0019S-A) 进行冰浴匀浆。10000rpm, 4℃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。
- CB0019S-B 置于37℃ 水浴中预热30 min。
- 在 EP 管中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				20
标准品		20		
蒸馏水	20			
CB0019S-B	200	200	200	200
CB0019S-C	200	200	200	200
混匀后置于37°C 水浴中保温15min。				
CB0019S-D	600	600	600	600
必须立即混匀，否则显色不完全。				
上清液			20	
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)，1020μL=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；Cpr：样本蛋白浓度 (mg/mL)，需要另外测定；W：样本质量，g；T：反应时间 (min)，15 min。

注意事项

- CB0019S-B, CB0019S-C, CB0019S-D 需 4°C避光保存。
- 若 CB0019S-D 变成蓝绿色，则不能使用。
- 加入 CB0019S-D 后必须立即混匀，否则显色不完全。
- 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

