

碱性磷酸酶(AKP/ALP)活性检测试剂盒说明书

Alkaline Phosphatase Assay Kit

分光光度法

货号: AK352

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK352-A	30ml ×1 瓶	4℃保存;
AK352-B	10ml ×1 瓶	4℃避光保存;
AK352-C	10ml ×1 瓶	4℃避光保存;
AK352-D	30ml ×1 支	4℃避光保存, 变成蓝绿色不能使用。
AK352-标准品	1ml ×1 支	标准品: 2μmol/mL 酚标准液, 4℃保存。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 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。

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。

粗酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g): AK352-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK352-A) 进行冰浴匀浆。10000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
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30 min, 调节波长到510 nm, 蒸馏水调零。
2. AK352-B 置于37℃ 水浴中预热30 min。
3. 在 EP 管中按列表中顺序加入上述试剂,

试剂名称	空白管 (ul)	标准管 (ul)	对照管 (ul)	测定管 (ul)
上清液				20
标准品		20		
蒸馏水	20			
AK352-B	200	200	200	200
AK352-C	200	200	200	200
混匀后置37℃ 水浴中保温15min;				
AK352-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。

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。

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

(2) 按照样本质量计算

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

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

2. 血液中 AKP/ALP 活力计算

活性单位定义: 37℃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。

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

注: C 标准品: 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), 0.020 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; 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:

1. AK352-B, AK352-C, AK352-D 需 4℃避光保存;
2. AK352-D 变成蓝绿色不能使用。
3. 加入 AK352-D 后必须立即混匀, 否则显色不完全。