

## 碱性磷酸酶（AKP/ALP）活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/48S

**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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器和蒸馏水。

### 试剂组成和配制：

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），2 μmol/mL 酚标准液，4℃ 保存。

### 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. 细菌或细胞：按照细菌或细胞数量（ $10^4$  个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 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/酶标仪预热 30min，调节波长到 510 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂三置于 37℃ 水浴中预热 30 min。
3. **空白管：**取 EP 管，加入 4μL 蒸馏水，40μL 试剂二，40μL 试剂三，混匀后置于 37℃ 水浴中保温 15min；加入试剂四 120μL，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 4μL 标准品，40μL 试剂二，40μL 试剂三，混匀后置于 37℃ 水浴中保温 15min；加入试剂四 120μL，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 4μL 上清液，40μL 蒸馏水，40μL 试剂三，混匀后置于 37℃ 水浴中保温 15min；加入试剂四 120μL，混匀后于 510nm 测定吸光度，记为 A 测定管。

6. **测定管**：取 EP 管，加入 4 $\mu$ L 上清液，40 $\mu$ L 试剂二，40 $\mu$ L 试剂三，混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中保温 15min；加入试剂四 120 $\mu$ L，混匀后于 510nm 测定吸光度，记为 A 测定管。

其中标准管和空白管只需做一管，测定管和对照管每个样均需做。

**注意**：空白管和标准管只需测定一次。

#### AKP/ALP 活性计算：

##### 1. 血液中 AKP/ALP 活力计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C 中每毫升血液每分钟催化产生 1 $\mu$ mol 酚定义为 1 个酶活单位。

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

##### 2. 组织、细菌或细胞中 AKP/ALP 活性计算

###### (1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C 中每毫克蛋白每分钟催化产生 1  $\mu$  mol 酚定义为 1 个酶活单位。

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

###### (2) 按照样本质量计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C 中每克组织每分钟催化产生 1  $\mu$  mol 酚定义为 1 个酶活单位。

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

###### (3) 按照细菌或细胞数量计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C 中每 10<sup>4</sup> 个细菌或细胞每分钟催化产生 1  $\mu$  mol 酚定义为 1 个酶活单位。AKP/ALP ( $\mu$ mol/min/10<sup>4</sup> cell)=[C 标准品 $\times$ (A 测定管-A 对照管) $\div$ (A 标准管-A 空白管) $\times$ V 反总] $\div$ (细胞数量 $\times$ V 样 $\div$ V 样总) $\div$ T= 6.8 $\times$ (A 测定管-A 对照管) $\div$ (A 标准管-A 空白管)  $\div$ 细胞数量

C 标准品：2 $\mu$ mol/mL；V 反总：反应体系总体积 (mL)，205 $\mu$ L=0.205mL； 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；W：样品质量；V 样：加入反应体系中上清液体积 (mL)，0.004mL；V 样总：提取液体积，1 mL；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。