

## 碱性磷酸酶 (AKP) 测试盒说明书(精简版)

(货号: A059-1-1 比色法 50 管/48 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

## 一、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 3 个月)

试剂	组份	包装规格	保存条件
试剂一	缓冲液	30mL×1 瓶	4℃冷藏
试剂二	基质液	30mL×1 瓶	短期 4℃保存, -20℃可保存半年
试剂三	显色剂	90mL×1 瓶	4℃避光
试剂四	1.1mg/mL 酚标准贮备液	0.5mL×1 支	4℃避光

0.1mg/mL 酚标准应用液配制: 1.1 mg/mL 酚标准贮备液: 蒸馏水=1:10 稀释, 现用现配

## 二、测定原理:

碱性磷酸酶分解磷酸苯二钠, 产生游离酚和磷酸, 酚在碱性溶液中与 4-氨基安替吡啉作用经铁氰化钾氧化生成红色醌衍生物, 根据红色深浅可以测定酶活力的高低。

## 三、所需仪器耗材及试剂:

含 520nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪及 96 孔板)、37℃水浴锅或恒温箱、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水 (0.9%) 或 PBS (0.1M)、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用, 本公司有售)。

## 四、操作过程:

## 1、样本前处理:

血清 (浆) 或其它液体样本可直接使用 (或稀释一定的倍数后使用);

组织样本: 准确称取组织重量, 按重量 (g): 体积 (mL) = 1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 制成 10% 组织匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。(取部分上清液测蛋白浓度, 蛋白定量试剂盒本所有售, 推荐用考马斯亮蓝法)

2、操作表: (正式实验前请挑选 2 例样本进行浓度梯度预试, 预试结果以测定-空白的 OD 差值在 0.2 左右为宜)

	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (mL)	0.05		
0.1mg/mL 酚标准应用液 (mL)		0.05	
样本液 (mL)			0.05
试剂一 (mL)	0.5	0.5	0.5
试剂二 (mL)	0.5	0.5	0.5
充分混匀 37℃水浴 15 分钟			
试剂三 (mL)	1.5	1.5	1.5
立即混匀, 室温静置 10min, 于 520nm, 1cm 光径, 空白管调零, 分光光度计测各管吸光度值。			

## 五、单位定义与计算:

## (一)、血清 (浆) 或其它液体样本中 AKP 的计算:

1、活力定义: 每 100mL 血清每 15 分钟在 37℃与基质作用产生 1mg 酚为 1 个活力单位 (金氏单位)。

## 2、计算公式:

$$\text{AKP 活力 (金氏单位/100mL)} = \frac{A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}} \times \frac{100\text{mL}}{V_{\text{样}}} \times N$$

$C_{\text{标准}}$ : 标准液浓度, 0.1mg/mL;

$V_{\text{标准}}$ : 加入的标准液体积, 0.05mL;

$V_{\text{样}}$ : 加入的样本液体积, 0.05mL;

$N$ : 样本测试前稀释倍数。

## (二)、组织匀浆中 AKP 的测定:

1、单位定义: 每克组织蛋白每 15 分钟在 37℃与基质作用产生 1mg 酚为 1 个金氏单位。

## 2、单位公式:

$$\text{组织中 AKP 活力 (金氏单位/gprot)} = \frac{A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}}} \times \frac{C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}}{C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}}$$

$C_{\text{标准}}$ : 标准液浓度, 0.1mg/mL;

$C_{\text{pr}}$ : 组织匀浆蛋白浓度, gprot/mL (prot 指蛋白);

$V_{\text{标准}}$ : 加入的标准液体积, 0.05mL;

$V_{\text{样}}$ : 样本取样量, 0.05mL。

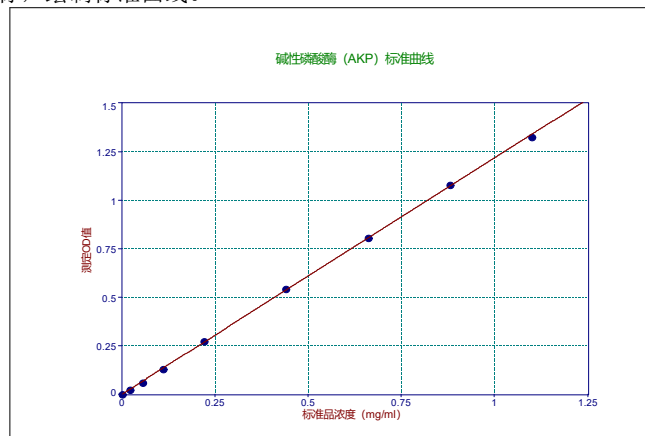
## 附录: AKP 标准曲线的制备

## 1、操作表:

管号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
1.1mg/mL 酚标准 (μL)	0	1	2.5	5	10	20	30	40	50
双蒸水 (μL)	50	49	47.5	45	40	30	20	10	0
缓冲液 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
基质液 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
充分混匀, 37℃水浴 15 分钟									
显色剂 (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
立即混匀, 波长 520nm, 光径 0.5cm, 0 管调零, 测各管吸光度值									

## 2、绘图如下:

以所测得的吸光度为纵坐标, 以相应的标准浓度单位为横坐标, 绘制标准曲线。



注: 标准曲线无须制作, 直接套用计算公式计算即可。