



碱性磷酸酶（AKP/ALP）测试盒说明书

(货号：A059-2 微板法)

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、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。

二、试剂组成与配制：（试剂盒有效期 6 个月）

	组份	48T (A059-2-1)	96T (A059-2-2)	保存条件
试剂一	缓冲液	3mL×1 瓶	6mL×1 瓶	4℃冷藏
试剂二	基质液	3mL×1 瓶	6mL×1 瓶	-20℃避光
试剂三	显色剂	9mL×1 瓶	18mL×1 瓶	4℃避光
试剂四	1.1mg/mL 酚标准贮备液	0.5mL×1 支	0.5mL×1 支	4℃避光

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

三、样本采集及保存：

- 按常规采集样本，样本可以是血清、血浆（肝素抗凝为佳）、细胞培养上清。组织或培养细胞（按实验方法进行样本前处理，然后进行测定）。
- 如样本收集后（如血清（浆）、组织、培养细胞、培养上清等）不能及时检测，请将样本放置于-20℃以下保存（温度越低越好）。

四、所需仪器及试剂：

可调 490~530nm 波长的酶标仪及 96 孔板（附送一块），37℃水浴锅或恒温箱，蒸馏水，蛋白测定试剂（动物组织或细胞用，本公司有售）。

五、操作步骤：

1、样本前处理：

血清（浆）样本：直接使用（鸡血清（浆）中 AKP 活力较高，一般需要用生理盐水 5 倍或 10 倍稀释后测定；其它种属可先预试后再批量测定）；

组织样本：准确称取待测组织的重量，按重量（g）：体积（mL）=1:9 的比例，加入生理盐水，冰水浴条件下机械匀浆，4000 转/分钟，离心 10 分钟，取上清液待测（上清液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售）；

细胞或培养液：参照附录 I。

注：正式实验前需要取 2 例预期差异大的样本进行预试，若酶活力过高可将其稀释后 A_{测定}-A_{空白}控制在 0.2 或 0.3 左右，若酶活力较低，则可增加上样量测定（参照附录 I）或延长 37℃反应时间，使得 A_{测定}-A_{空白}尽量大于 0.02。

2、操作表：

	空白孔	标准孔	测定孔
双蒸水（μL）	5		
0.1mg/mL 酚标准液（μL）		5	
待测样本（μL）			5
试剂一（μL）	50	50	50
试剂二（μL）	50	50	50
轻轻振摇孔板混匀，37℃孵育 15 分钟			
试剂三（μL）	150	150	150
轻轻振摇孔板混匀，波长 520nm，酶标仪测定各孔吸光度值 A			

六、活力定义及计算：

1、液体样本计算方式：（适用于培养液、血清、血浆等液体样本的计算）

定义：100mL 血清或液体在 37℃与基质作用 15 分钟产生 1mg 酚为 1 个金氏单位。

计算公式：

$$\text{液体样本 AKP 活力 (金氏单位/100mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 100 \times N$$

C_{标准}：酚标准液浓度，0.1mg/mL；N：样本测试前稀释倍数。

2、组织计算公式：（适用于培养细胞、组织等相关样本的计算）

定义：每克组织蛋白在 37℃与基质作用 15 分钟产生 1mg 酚为 1 个金氏单位。

计算公式：

$$\text{组织、细胞样本 AKP 活力 (金氏单位/gprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div Cpr$$

C_{标准}：酚标准液浓度，0.1mg/mL；

Cpr：样本蛋白浓度，gprot/mL（prot 指蛋白）。

八、注意事项：

- 如果所用的酶标仪没有 520nm 波长，可在 490nm~530nm 范围内选择，越靠近 520nm 越好，且 510nm 相较 530nm 更好。
- 由于加样量比较少，建议加样时将吸头靠近酶标板底部，缓慢加样，边加边将吸头上移，以保证吸头上样本残留量最少，减少加样方面存在的误差。
- 所加试剂接近于水剂，所以对吸头的黏附性很小，但加试剂时还是要注意，速度不宜太快，以免溅出酶标孔外。
- 加样或加试剂若靠孔壁加入则需靠近底部，前部分处理反应液量比较少，若靠近上端加样则会有部分黏附于酶标孔上端，从而造成反应不完全。
- 酶标孔比较小，所以混匀力度要适中，太剧烈则可能将液体溅出，太慢则混匀不充分；先将孔壁上的液体轻轻的震动落下，再前后、左右的摇动。
- 一般对于酶标板可能存在初始吸光度的差异，可在使用之前先在相应的波长处测定其空板的吸光度，然后再加样测定，计算时各孔测得值均先减去对应孔的空孔值再代入公式计算。
- 本试剂盒仅用于科研、实验室。

九、技术参数：

项目序号	指标名称	指标要求
1	空白孔吸光度值	≤0.150
2	试剂盒批内 CV	≤3%
3	试剂盒批间 CV	≤5%
4	试剂盒回收率	98%
5	线性范围 0~60 金氏单位/100mL	R ² =0.9999



附录 I：培养液及培养细胞中 AKP 测定

一、样本前处理：

1、**细胞培养液**：吸取培养液，1000 转/分钟，离心 10 分钟，取上清液进行测定。

2、**培养细胞**：①、**培养细胞的收集**：

悬浮培养细胞：可直接通过离心收集沉淀细胞（1000~2000 转/分钟，离心 10 分钟，弃上清留沉淀细胞）；

贴壁培养的细胞：可通过细胞刮直接将细胞刮下；或者吸去上清，用 0.25% 的胰酶室温消化 2~3 分钟，加培养液终止消化，用微量移液器轻轻吹打，将所有液体吸出转入 EP 管，然后 1000 转/分钟，离心 10 分钟弃上清，留沉淀细胞，再加入 1mL PBS 轻轻吹打，再次 1000 转/分钟，离心 10 分钟弃上清，留沉淀细胞待用。如暂时不做，则可以将细胞沉淀物 -20℃ 以下冻存，温度越低越好。

②、**培养细胞的破碎**：

研磨破碎：在细胞沉淀中加入一定量（ 10^6 的细胞一般加 0.3~0.5mL）的缓冲液（缓冲液可以用 PBS 或者是生理盐水），用手动玻璃匀浆器冰水浴研磨 3~5 分钟，或者是用卡富隆电动研磨器冰水浴研磨 3 分钟待测；

超声破碎：在细胞沉淀中加入一定量（ 10^6 的细胞一般加 0.3~0.5mL）的缓冲液（缓冲液可以用 PBS 或者是生理盐水），需保证超声探头在液面以下。功率 300W，冰水浴，每 3~5S 超声一次，间隔 4 次（每次间隔时间为 30S 左右）

化学裂解：贴壁培养的细胞，可将上清吸去后，直接在孔板或是瓶中加入一定量的裂解液（覆盖满细胞），裂解 30~40 分钟（可用显微镜观察细胞破碎情况），再用微量移液器吸出待测。根据需要可用生理盐水或 PBS 进行一定的稀释。

二、**操作表**：（先将 0.1mg/mL 酚标准液用蒸馏水再 5 倍（1：4）稀释成 0.02mg/mL 酚标准液按下表操作）

	空白孔	标准孔	测定孔
双蒸水（ μL ）	30		
0.02mg/mL 酚标准液（ μL ）		30	
待测样本（ μL ）			30
试剂一（ μL ）	50	50	50
试剂二（ μL ）	50	50	50
充分混匀 37℃ 孵育 15 分钟			
试剂三（ μL ）	150	150	150
轻轻振摇孔板混匀，波长 520nm，酶标仪测定各孔吸光度值 A			

附录 II：AKP 标准曲线制作（选做）

一、**前处理**：

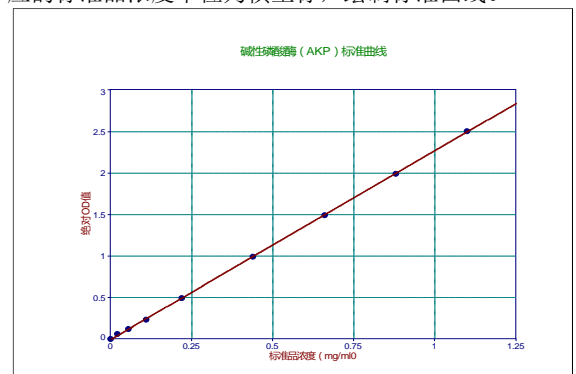
将标准品贮备液用蒸馏水 50 倍、20 倍、10 倍、5 倍、2.5 倍、1.25 倍稀释及原液操作（浓度为 0.022 mg/mL、0.055 mg/mL、0.11 mg/mL、0.22 mg/mL、0.44 mg/mL、0.88 mg/mL、1.1 mg/mL）

二、**操作表**：

	空白孔	标准孔
双蒸水（ μL ）	5	
不同浓度的酚标准液（ μL ）		5
试剂一（ μL ）	50	50
试剂二（ μL ）	50	50
轻轻振摇孔板混匀，37℃ 孵育 15 分钟		
试剂三（ μL ）	150	150
轻轻振摇孔板混匀，波长 520nm，酶标仪测定吸光度值 A		

三、**测定结果**：

以所测得的绝对吸光度（绝对 OD 值）为纵坐标，以相应的标准品浓度单位为横坐标，绘制标准曲线。



标准曲线可以不做，按操作表操作后代入计算公式计算即可，不影响结果。

若是有做标曲，则可将样本测定孔吸光度值减去空白孔吸光度值后，代入标曲计算得到的值替换前面公式中的

$$\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$$

再继续运算，即可得最终结果。