

M5 组织及血液碱性磷酸酶检测试剂盒 使用说明书

Product	Unit	Cat.#
M5 组织及血液碱性磷酸酶检测试剂盒	48T	MF642-01

【储存温度】：4℃保存。

【组分】：

试剂 A：液体×1 瓶，4℃保存。
试剂 B：液体×1 瓶，4℃避光保存。
试剂 C：液体×1 瓶，4℃避光保存。
试剂 D：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。

【产品介绍】：

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。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。

【注意事项】： 1. 试剂 B、试剂 C 和试剂 D 均需避光保存。

2. 试剂 D 变蓝绿色后不能再使用。

3. 加入试剂 D 后必须立即混匀，否则显色不完全。

【所需仪器和试剂】：紫外分光光度计/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。

【操作步骤】：

正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

一、粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂 A 体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂 A）进行冰浴匀浆，4℃、8000g 离心 10min，取上清液待测。

2. 血液可直接测定，或者适当稀释后测定。

二、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 C 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 B，40μL 试剂 C，混匀后置于 37℃水浴中保温 15min；加入试剂 D 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 B，40μL 试剂 C，混匀后置于 37℃水浴中保温 15min；加入试剂 D 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 40 μ L 试剂 B，40 μ L 试剂 C，混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中保温 15min；加入试剂 D 120 μ L，混匀；最后加入 4 μ L 上清液，混匀后于 510nm 测定吸光度，记为 A 对照管。

6. 测定管：取 EP 管，加入 4 μ L 上清液，40 μ L 试剂 B，40 μ L 试剂 C，混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中保温 15min；加入试剂 D 120 μ 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。

三、AKP/ALP 活性计算：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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 μ mol 酚定义为 1 个酶活单位。

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

C 标准品：2 μ mol/mL；V 反总：反应体系总体积（mL），1020 μ L=1.02 mL；V 样：加入反应体系中上清液体积（mL），0.020mL；V 样总：1mL；T：反应时间（min），15 min。

2. 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 $^{\circ}$ C 中每毫克蛋白每分钟催化产生 1 μ mol 酚定义为 1 个酶活单位。

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

(2) 按照样本质量计算

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

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

C 标准品：2 μ mol/mL；V 反总：反应体系总体积（mL），205 μ 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。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

3. 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 μ mol 酚定义为 1 个酶活单位。

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

C 标准品：2 μ mol/mL；V 反总：反应体系总体积（mL），1020 μ L=1.02 mL；V 样：加入反应体系中上清液体积（mL），0.020mL；V 样总：1mL；T：反应时间（min），15 min。

4. 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 $^{\circ}$ C 中每毫克蛋白每分钟催化产生 1 μ mol 酚定义为 1 个酶活单位。

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

标准管-A 空白管) ÷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 1 μ mol 酚定义为 1 个酶活单位。

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

C 标准品：2 μmol/mL；V 反总：反应体系总体积（mL），205 μL=0.205 mL；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），0.004 mL；V 样总：提取液体积，1 mL；T：反应时间（min），15 min。



Please note: All products are "FOR RESEARCH USE ONLY AND ARE NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE"