

碱性磷酸酶（AKP/ALP）检测试剂盒（分光光度法）

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。

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 μ mol/mL 酚标准液，4℃保存。

粗酶液提取：

- 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。
- 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。
- 血液可直接测定，或者适当稀释后测定。

测定操作表：

- 分光光度计预热 30min，调节波长到 510 nm，蒸馏水调零。
- 试剂三置于 37℃水浴中预热 30 min。
- 空白管：**取 EP 管，加入 20 μ L 蒸馏水，200 μ L 试剂二，200 μ L 试剂三，混匀后置于 37℃水浴中保温 15min；加入试剂四 600 μ L，混匀后于 510 nm 测定吸光度，记为 A 空白管。
- 标准管：**取 EP 管，加入 20 μ L 标准品，200 μ L 试剂二，200 μ L 试剂三，混匀后置于 37℃水浴中保温 15min；加入试剂四 600 μ L，混匀后于 510 nm 测定吸光度，记为 A 标准管。
- 对照管：**取 EP 管，加入 20 μ L 上清液，200 μ L 蒸馏水，200 μ L 试剂三，混匀后置于 37℃水浴中保温 15min；加入试剂四 600 μ L，混匀后于 510 nm 测定吸光度，记为 A 测定管。

6. **测定管**:取 EP 管,加入 **20 μ L 上清液**,200 μ L 试剂二,200 μ L 试剂三,混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中保温 15min;加入试剂四 600 μ L,混匀后于 510 nm 测定吸光度,记为 A 测定管。

注意:空白管和标准管只需测定一次,每个测定管设一个对照管。

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 μ mol 酚定义为 1 个酶活单位。

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

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 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。

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

(3) 按照细菌或细胞数量计算

活性单位定义:37 $^{\circ}$ C 中每 10⁴ 个细菌或细胞每分钟催化产生 1 μ mol 酚定义为 1 个酶活单位。

$$\text{AKP/ALP}(\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\text{C 标准品}\times(\text{A 测定管}-\text{A 对照管})\div(\text{A 标准管}-\text{A 空白管})\times\text{V 反总}]\div(\text{细胞数量}\times\text{V 样}\div\text{V 样总})\div\text{T} \\ =6.8\times(\text{A 测定管}-\text{A 对照管})\div(\text{A 标准管}-\text{A 空白管})\div\text{细胞数量}$$

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:加入提取液体积, 1mL;

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。