



碱性磷酸酶 (AKP/ALP) 活性检测试剂盒

Alkaline Phosphatase (AKP/ALP) Activity Assay Kit

Disodium Phenyl Phosphate



Alkaline Phosphatase (AKP/ALP)

Free Phenol



4-Aminoantipyrine
Potassium Ferricyanide

Red Quinone Derivatives

北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



碱性磷酸酶 (AKP/ALP) 活性检测试剂盒

Alkaline Phosphatase (AKP/ALP) Activity Assay Kit

一、产品描述

碱性磷酸酶是一种能够将对底物去磷酸化的含锌糖蛋白酶，广泛分布于人体各脏器中，在碱性条件下，可以催化多种底物的水解，包括各种天然及人工合成的磷脂单酯化合物，通过水解磷酸单酯将底物分子上的磷酸基团除去，生成磷酸根离子和自由羟基。碱性磷酸酶可作为免疫诊断试剂的标记酶，并在骨骼、肝胆系统疾病的诊断和鉴别方面具有重要应用。

碱性磷酸酶在碱性环境中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生成红色亚醌衍生物，产物在 510 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征碱性磷酸酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	4°C避光保存	-
试剂二	液体 25 mL×1 瓶	4°C避光保存	-
试剂三	液体 75 mL×1 瓶	4°C避光保存	变为蓝绿色则停止使用
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C避光保存	20 μmol/mL 酚标准液
标准稀释液的制备（现用现配）：使用前将 20 μmol/mL 酚标准液使用蒸馏水稀释至 4.0、3.0、2.0、1.0、0.5、0.25 μmol/mL 即为标准稀释液。			

序号	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度 (μmol/mL)	20	20	20	2.0	1.0	0.5
标准液体积 (μL)	200	150	100	200	200	200
蒸馏水体积 (μL)	800	850	900	200	200	200
稀释后浓度 (μmol/mL)	4.0	3.0	2.0	1.0	0.5	0.25

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿（光径 10 mm、狭缝 3 mm、体积 1.05 mL）、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

③血液、培养液等液体样本：直接检测或使用提取液适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 510 nm，蒸馏水调零。

②在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μ L)	对照管 (μ L)	标准管 (μ L)	空白管 (μ L)
粗酶液	20	-	-	-
标准稀释液	-	-	20	-
蒸馏水	-	-	-	20
试剂一	200	200	200	200
试剂二	200	200	200	200
充分混匀，37℃准确反应 15 min				
试剂三	600	600	600	600
粗酶液	-	20	-	-
立即充分混匀				

注：加入试剂三后应立即充分混匀，否则会造成显色不完全

吸光值测定：将反应液置于 1 mL 玻璃比色皿中，测定 510 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。注：每个样本均需设一个对照管，各浓度标准管和空白管只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 4.0、3.0、2.0、1.0、0.5、0.25 $\mu\text{mol/mL}$ 为横坐标（x），以其对应的 ΔA 标准为纵坐标（y），绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 带入公式中得到 x（ $\mu\text{mol/mL}$ ）。

3.碱性磷酸酶（AKP/ALP）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：37℃条件下，每 mg 组织蛋白每分钟催化生成 1 μmol 酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{AKP/ALP (U/mg prot)} = \frac{x \times V_{\text{样}}}{\text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{0.0667 \times x}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：37℃条件下，每 g 组织样本每分钟催化生成 1 μmol 酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{AKP/ALP (U/g)} = \frac{x \times V_{\text{提}}}{W \times T} = \frac{0.0667 \times x}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：37℃条件下，每 10⁴ 个细菌或细胞每分钟催化生成 1 μmol 酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{AKP/ALP (U/10}^4\text{ cell)} = \frac{x \times V_{\text{提}}}{\text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{0.0667 \times x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：37℃条件下，每 mL 液体样本每分钟催化生成 1 μmol 酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{AKP/ALP (U/mL)} = \frac{x \times V_{\text{样}}}{V_{\text{样}} \times T} = 0.0667 \times x$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V 提：粗酶液总体积，1 mL；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；细菌或细胞数量：以万计，若 500 万细菌或细胞则代入 500 即可；T：酶促反应时间，15 min。

四、注意事项

- ①反应过程中加入试剂三后必须立即充分混匀，否则会导致显色不完全；
- ②粗酶液制备完成后需置于冰上放置，且当天完成活性检测；
- ③若测定吸光值超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将粗酶液使用**提取液**适当稀释后再进行检测，低于最低值建议适当增加样本量或延长 37℃准确反应时间后再进行检测，计算时相应修改；
- ④试剂三颜色应为黄色，变为蓝绿色则已失效应停止使用；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

