

## 碱性磷酸酶（alkaline phosphatase, AKP）检测试剂盒说明书

（货号：G0904F 分光法 48 样）

### 一、产品简介：

磷酸酶是一种重要的水解酶。碱性磷酸酶（AKP，EC 3.1.3.1）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。本试剂盒提供一种高灵敏度，简单，直接的检测方法，使用磷酸对硝基苯酯（pNPP）作为底物，生成黄色的产物 PNP，该产物在 405nm 处有最大吸收峰。通过检测 PNP 在 405nm 下的增加速率，即可得到碱性磷酸酶（AKP）活性的大小。

### 二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×2 瓶	4℃保存	每瓶临用前加 4.5mL 试剂一，混匀待用，现配现用，一周内用完。
试剂三	液体 5mL×1 支	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

### 三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、水浴锅、可调式移液器。

### 四、碱性磷酸酶（AKP）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

- ① 组织样本：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，4℃、12000rpm 离心 15min，取上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例提取

- ② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ $10^4$ ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本：可直接测定，或者适当稀释后测定。若浑浊，离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

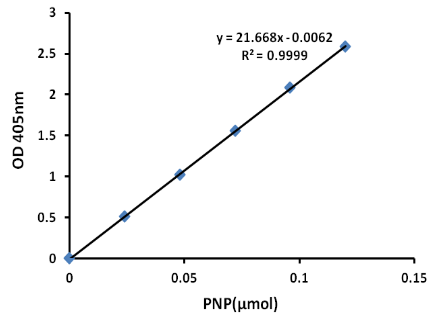
- ① 可见分光光度计预热 30min，调节波长到 405nm，蒸馏水调零。

- ② 在 EP 管或 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（ $\mu$ L）	测定管	空白管（只做一次）
样本	40	
试剂一	520	560
试剂二	160	160
混匀，避光反应，37℃水浴或恒温培养箱孵育 15min		
试剂三	80	80
混匀，在 37℃下静置 5min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

### 五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 21.668x - 0.0062$ ，x 是 PNP 摩尔质量： $\mu\text{mol}$ ；y 是  $\Delta A$ 。



## 2、按照样本蛋白浓度计算：

酶活定义：37°C中每毫克蛋白每分钟水解 1μmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{AKP}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot})=[(\Delta\text{A}+0.0062)\div 21.668]\div(\text{Cpr}\times\text{V1})\div\text{T}\times\text{D}=0.077\times(\Delta\text{A}+0.0062)\div\text{Cpr}\times\text{D}$$

## 3、按照样本质量计算：

酶活定义：37°C中每克组织每分钟水解 1μmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{AKP}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[(\Delta\text{A}+0.0062)\div 21.668]\div(\text{W}\times\text{V1}\div\text{V})\div\text{T}\times\text{D}=0.077\times(\Delta\text{A}+0.0062)\div\text{W}\times\text{D}$$

## 4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：37°C中每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟水解 1nmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{AKP}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{ cell})&=[(\Delta\text{A}+0.0062)\div 21.668]\times 10^3\div(500\times\text{V1}\div\text{V})\div\text{T}\times\text{D} \\ &=0.154\times(\Delta\text{A}+0.0062)\times\text{D}\end{aligned}$$

## 5、按液体体积计算：

酶活定义：37°C中每毫升液体每分钟水解 1μmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{AKP 活力}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL})=[(\Delta\text{A}+0.0062)\div 21.668]\div\text{V1}\div\text{T}\times\text{D}=0.077\times(\Delta\text{A}+0.0062)\times\text{D}$$

V---提取液体积，1 mL；

V1---样本体积 (mL)，0.04mL；

T---反应时间 (min)，15 min；

W---样品质量；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

500---细胞数量，万；

Cpr---粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL)，建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (10μmol/mL)：向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解，若有结晶析出，需 37°C 水浴至完全溶解。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3 μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照 40μL 的各个浓度标准品+680μL 试剂一+80μL 试剂三，混匀 5min 后于 405nm 处读值，根据结果即可制作标准曲线。