

碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 活性测定试剂盒说明书

(货号: G0904W48 微板法 48 样)

一、产品简介:

磷酸酶是普遍存在的一种重要的水解酶,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°C保存 | |
| 试剂一 | 液体 10mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂二 | 粉剂 mg×2 支 | 4°C保存 | 每瓶临用前加 1.1mL 试剂一,混匀待用,现配现用,一周内用完。 |
| 试剂三 | 液体 1.5mL×1 支 | 4°C保存 | |
| 标准品 | 粉剂 mg×1 支 | 4°C保存 | 若重新做标曲,则用到该试剂。 |

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器和蒸馏水。

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°C、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°C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:

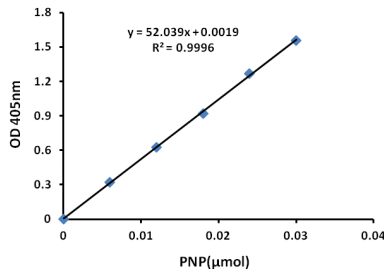
- ① 酶标仪预热 30min,调节波长到 405nm。

- ② 在 96 孔板中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 空白管 (只做一次) |
|---|-----|------------|
| 样本 | 10 | |
| 试剂一 | 130 | 140 |
| 试剂二 | 40 | 40 |
| 混匀,避光反应,37°C水浴或恒温培养箱孵育 15min | | |
| 试剂三 | 20 | 20 |
| 混匀,在 37°C下静置 5min,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： $y = 52.039x + 0.0019$ ， x 是 PNP 摩尔质量： μmol ， y 是 ΔA 。



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 1 μmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{AKP}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A - 0.0019) \div 52.039] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \times D = 0.128 \times (\Delta A - 0.0019) \div \text{Cpr} \times D$$

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 1 μmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{AKP}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0019) \div 52.039] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 0.128 \times (\Delta A - 0.0019) \div W \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每分钟水解 1nmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{AKP}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0019) \div 52.039] \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.26 \times (\Delta A - 0.0019) \times D$$

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 1 μmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{AKP 活力}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A - 0.0019) \div 52.039] \div V1 \div T \times D = 0.128 \times (\Delta A - 0.0019) \times D$$

V---提取液体积，1 mL；

V1---加入反应体系中上清液体积 (mL)，0.01mL；

T---反应时间 (min)，15 min；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

W ---样品质量；

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 (10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)：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 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照 10 μL 的各个浓度标准品+170 μL 试剂一+20 μL 试剂三，混匀 5min 后于 405nm 处读值，根据结果即可制作标准曲线。