

# 碱性磷酸酶(alkalinephosphatase,AKP)活性

## 测定试剂盒-微板法

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

### 使 用 说 明 书

货号: JL-T0946

有效期: 6个月

规格: 48T(40S)/96T(88S)

保存温度: 2-8°C

**实验原理：**

pH=10 条件下，碱性磷酸酶催化磷酸苯二钠水解，生成游离酚和磷酸。酚在碱性溶液中与 4-氨基安替吡啉结合，并经铁氰化钾氧化生成红色的醌的衍生物，根据红色的深浅计算酶活的高低。本试剂盒检测组织和细胞样本时，推荐使用本公司的 BCA 蛋白定量试剂盒，货号：JL-T0336。

**检测范围：0.13-50 金式单位/100mL      灵敏度：0.13 金式单位/100mL**

**注意事项：**

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

**产品组成:**

试剂名称	规格 (48T/40S)	规格 (96T/88S)	保存条件
试剂一	2.5mL×1 瓶	5mL×1 瓶	2-8℃, 避光
试剂二 A	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃, 避光
试剂二 B	2.5mL×1 瓶	2.5mL×2 瓶	2-8℃
试剂三	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	2-8℃, 避光
标准品 (0.5mg/mL)	1mL×1 瓶	2mL×1 瓶	2-8℃, 避光

**所需仪器耗材及试剂:**

离心机、酶标仪、96 孔板、可调式移液器、蒸馏水、生理盐水 (0.9%NaCl) 或 PBS (0.01M, pH7.4)、恒温箱。

## 样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**，建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.13-50 金式单位/100mL，如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩，样本的稀释液为生理盐水或 PBS(0.01M,pH7.4)。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。
3. **组织样本**:称取约 0.1g 组织,加入 1mL 生理盐水(0.9%NaCl)或 PBS(0.01M, pH7.4) 进行冰浴匀浆, 4°C, 10000 g 离心 10min, 取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。
4. **细胞样本**: 取约  $10^6$  个细胞加入 300-500 $\mu$ L 生理盐水 (0.9%NaCl) 或 PBS (0.01M, pH7.4) 匀浆。匀浆后, 4°C, 10000 g 离心 10min, 取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。
5. **血清 (浆) 等液体样本**: 取直接测定 (若有浑浊则离心后取上清测定) 。

## 检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温，
2. **试剂二的配制**：临用前取一瓶试剂二 B 加入一瓶试剂二 A 中，混合均匀。
3. **工作液的配制**：按试剂一：试剂二为 1：1 的体积比混匀，现用现配，未用完的试剂 2-8℃ 避光可保存 1 天。
4. **标准品溶液的配制**：取一支标准品 (0.5mg/mL) 用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg/mL。

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mg/mL)	0	0.025	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
0.5mg/mL 标准品(μL)	0	5	10	20	40	60	80	100
蒸馏水(μL)	100	95	90	80	60	40	20	0

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准孔加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用蒸馏水稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

**操作步骤：**

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 520nm。
2. 样本测定（在 96 孔板中依次加入）：

试剂名称(μL)	标准孔	测定孔
不同浓度标准品	5	
样本		5
工作液	100	100
混匀（酶标仪震板 30s），37°C 孵育 15min。		
试剂三	100	100
混匀，在 520nm 处波长检测各孔吸光值。		

注：操作时，加完工作液置 37°C 孵育 15 min，迅速加入试剂三，避免长时间放置后加样导致结果不准确。

## 实验结果结算：

1. **标准品拟合曲线：**  $y=ax+b$ 。

2. **血清（浆）等液体样本中 ALP 活力计算：**

定义：100mL 血清在 37°C 与基质作用 15min 产生 1 mg 酚为 1 个金式单位。

$$\begin{aligned} \text{ALP 活力} \\ (\text{金式单位}/100\text{mL}) \end{aligned} = (\Delta A - b) \div a \times V \times N$$

3. **组织、细胞中 ALP 活力计算：**

定义：每克组织或细胞蛋白在 37°C 与基质作用 15min 产生 1mg 酚为 1 个金式单位。

$$\begin{aligned} \text{ALP 活力} \\ (\text{金式单位}/\text{gport}) \end{aligned} = (\Delta A - b) \div a \div \text{Cpr} \times N$$

### 注：

y：标准品 OD 值-空白 OD 值  
(标准品浓度为 0 时的标准品)

$\Delta A$ ：测定孔 OD 值-空白孔 OD 值  
(标准品浓度为 0 时的标准品)

a：标曲的斜率

V：单位定义中血清体积，100mL

b：标曲的截距

Cpr：待测样本的蛋白浓，mg/mL

x：标准品浓度

N：样本稀释倍数

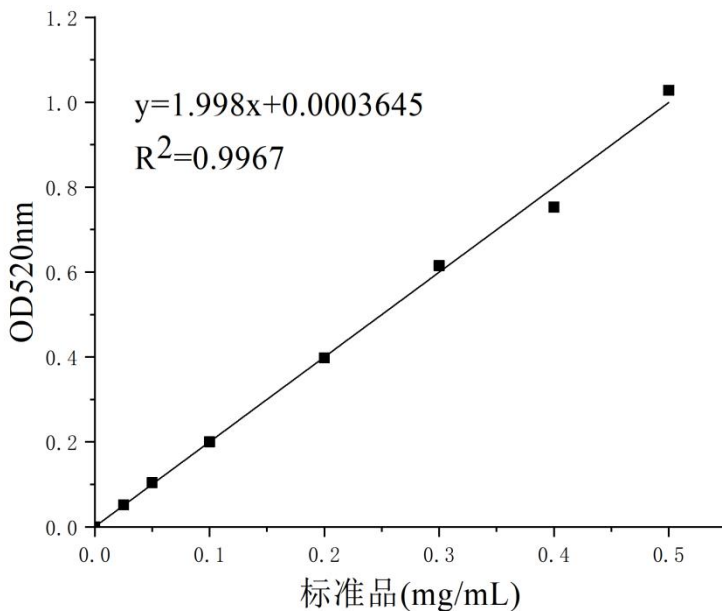
**参考样本数据：**

以下数据仅供参考：

样本类型	稀释倍数	参考值
人血清	不稀释	5.13 金式单位/100mL
人尿液	不稀释	9.34 金式单位/100mL
大鼠肝脏 (10%匀浆)	不稀释	6.41 金式单位/gport
大鼠肾脏 (10%匀浆)	5 倍稀释	159.88 金式单位/gport

**参考曲线:**

$y=1.998x+0.0003645, R^2=0.9967$ ,  $x$  是标准品的浓度 (mg/mL),  $y$  是 $\Delta A$ 。



注意：本图仅供参考，应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。

**Note:**

**Note:**

**咨询电话：400-0066-400**

**传 真：021-55660885**

**电子邮箱：shjls@163.com**

**网 址：www.jonln.com**