

Alkaline Phosphatase Activity Assay Kit

碱性磷酸酶(AKP/ALP)活性检测试剂盒 微板法

产品编号	产品名称	规格
BL862B	碱性磷酸酶(AKP/ALP)活性检测试剂盒 微板法	96T

产品简介:

磷酸酶是一种重要的水解酶。碱性磷酸酶（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 广泛分布于人体肝脏、骨骼、肠、肾和胎盘等组织，是经肝脏向胆外排出的一种酶。生物学中 AKP 水平的变化及其活性的高低常被作为一种检测组织行为的指标。例如，作为 iPS 成功诱导的标志：相对于在大多数类型细胞的表达，AKP 在 iPS 细胞内，表达水平会明显升高等。

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。产物颜色越深，说明 ALP 活性越高，反之则活性越低。因此，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。

产品组成:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉末×2 支	4°C保存	每瓶临用前加 2.1ml 试剂一，混匀待用，现配现用，一周内用完
试剂三	液体 3mL×1 支	4°C保存	
标准品	粉末×1 支	4°C保存	若重新做标曲，则用到该试剂

使用方法:

建议正式实验前，选取 2 个样本做预测定，了解实验样品情况，熟悉流程，避免样本和试剂浪费！

一、样本准备:

1. 组织样本准备:

- 称取约 0.1g 样本组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆；
- 10000-12000g，4°C离心 15min，取上清液，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可以按照组织质量（g）：提取液为 1：5~10 的比例提取

2. 细菌/细胞样本准备:

- 收集细菌或细胞到离心管内，离心弃上清；
- 取约 5×10^6 个细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，强度 20% 或 200W，超声 3S，间隔 10S，重复 30 次）；
- 10000-12000g，4°C离心 10min，取上清液，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌/细胞加入 1mL 提取液进行提取

3. 液体样本准备:

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



澄清的液体直接检测；若浑浊则离心后取上清检测。

二、样品测定：

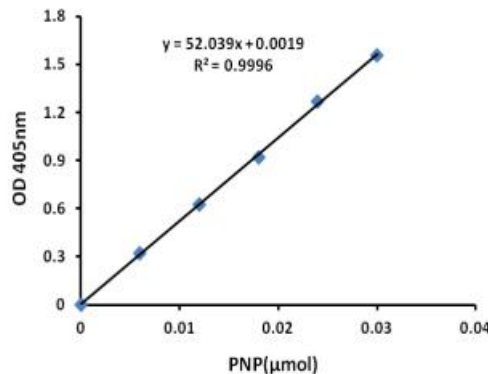
1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm。
2. 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

- 【注】：1 最后一步检测时，若有结晶析出，需要 37°C复溶再读取吸光值。
 2. 若 ΔA 的值非常低在零附近，可增加样本量 V1（如增至 20μL，则试剂一相应减少）或延长反应时间 T（如增至 30min 或更长），则重新调整的 V1 和 T 须代入公式重新计算。
 3. 若 ΔA 的值超过 1，则需要稀释样本，稀释倍数 D 代入计算公式。
 4. 若样本上清液颜色较深且偏黄色，可增加样本自身对照管，消除背景色造成的影响。对照管为：10μL 样本+130μL 试剂一+40μL 蒸馏水，37°C水浴或恒温培养箱孵育 15min 后，再加 20μL 试剂三，37°C下静置 5min 后于 405nm 读值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。若设定对照管，则可检测样本由 96 样减少为 48 样。

三、含量计算

1. 标准曲线方程： $y = 52.039x + 0.0019$ ；x 是 PNP 摩尔质量：μmol；y 是 ΔA 。



2. 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。

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

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 1μmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

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

4. 按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：37°C中每 10⁴ 个细胞每分钟水解 1nmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

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

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
 注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



5. 按照液体体积计算:

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

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

V----加入提取液体积, 1 mL

V1----加入样本体积, 0.01mL

T----反应时间, 15min

W----样本质量

D---稀释倍数, 未稀释即为 1

500---细胞数量, 万

Cpr----样本蛋白质浓度, mg/mL

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (10 μ mol/mL): 向标准品离心管里面加入 1.4ml 蒸馏水溶解, 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 μ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。

注意事项:

- 1、 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
- 2、 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期:

4°C 保存六个月。

