

碱性磷酸酶 (AKP) 测试盒

(货号: BC127 微板法)

一、测定原理:

碱性磷酸酶分解磷酸苯二钠, 产生游离酚和磷酸, 酚在碱性溶液中与 4-氨基安替吡啉作用经铁氰化钾氧化生成红色醌衍生物, 根据红色深浅可以测定酶活力的高低。

二、试剂盒组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

	组份	48T	96T	保存条件
试剂一	缓冲液	3mL×1 瓶	6mL×1 瓶	4℃冷藏
试剂二	基质液	3mL×1 瓶	6mL×1 瓶	-20℃避光
试剂三	显色剂	9mL×1 瓶	18mL×1 瓶	4℃避光
试剂四	1.1mg/mL 酚标准贮备液	0.5mL×1 支	0.5mL×1 支	4℃避光
0.1mg/mL 酚标准液配制: 1.1 mg/mL 酚标准贮备液 : 蒸馏水=1 : 10 稀释, 现用现配				

三、样本采集及保存:

- 按常规采集样本, 样本可以是血清、血浆 (肝素抗凝为佳)、细胞培养上清。组织或培养细胞 (按实验方法进行样本前处理, 然后进行测定)。
- 如样本收集后 (如血清 (浆)、组织、培养细胞、培养上清等) 不能及时检测, 请将样本放置于 -20℃ 以下保存 (温度越低越好)。

四、所需仪器及试剂:

可调 490 ~ 530nm 波长的酶标仪及 96 孔板 (附送一块), 37℃ 水浴锅或恒温箱, 蒸馏水, 蛋白测定试剂 (动物组织或细胞用, 本公司有售)。

五、操作步骤:

1、样本前处理:

血清 (浆) 样本: 直接使用 (鸡血清 (浆) 中 AKP 活力较高, 一般需要用生理盐水 5 倍或 10 倍稀释后测; 其它种属可先预试后再测);

组织样本: 准确称取待测组织的重量, 按重量 (g): 体积 (mL)=1:9 的比例, 加入生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 2500 转/分钟, 离心 10 分钟, 取上清液待测 (上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售);

细胞或培养液: 参照附录 I。

2、操作表:

	空白孔	标准孔	测定孔
双蒸水 (μL)	5		
0.1mg/mL 酚标准液 (μL)		5	
待测样本 (μL)			5
试剂一 (μL)	50	50	50
试剂二 (μL)	50	50	50
轻轻振摇孔板混匀, 37℃ 振荡反应 15 分钟			
试剂三 (μL)	150	150	150
轻轻振摇孔板混匀, 波长 520nm, 酶标仪测定各孔吸光度值 A			

六、技术参数：

项目序号	指标名称	指标要求
1	空白孔	≤0.150
2	试剂盒批内 CV	≤3%
3	试剂盒批间 CV	≤5%
4	试剂盒回收率	98%
5	线性范围 0 ~ 60 金氏单位/100mL	R ² =0.9999

七、计算公式：

1、液体样本计算方式：（适用于培养液、血清、血浆等液体样本的计算）

定义：100mL 血清或液体在 37℃与基质作用 15 分钟产生 1mg 酚为 1 个金氏单位。

计算公式：

$$\text{液体样本AKP活力 (金氏单位/100mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 100 \times N$$

C_{标准}：酚标准液浓度，0.1mg/mL； **N**：样本测试前稀释倍数。

2、组织计算公式：（适用于培养细胞、组织等相关样本的计算）

定义：每克组织蛋白在 37℃与基质作用 15 分钟产生 1mg 酚为 1 个金氏单位。

计算公式：

$$\text{组织、细胞样本AKP活力 (金氏单位/gprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

C_{标准}：酚标准液浓度，0.1mg/mL；

C_{pr}：样本蛋白浓度，gprot/mL（prot 指蛋白）。

八、计算举例：

例 1：取人血清 5μL 按照操作表进行 AKP 测定，得空白孔吸光度为 0.0233，标准孔吸光度为 0.2603，测定孔吸光度为 0.1585，则计算如下：

$$\begin{aligned} \text{血清AKP活力 (金氏单位/100mL)} &= \frac{0.1585 - 0.0233}{0.2603 - 0.0233} \times 0.1 \times 100 \times 1 \\ &= 5.7046 \text{ 金氏单位/100mL} \end{aligned}$$

例 2：用生理盐水将大鼠血清 1: 1 稀释后取 5μL 按照操作表进行 AKP 测定，得空白孔吸光度为 0.0233，标准孔吸光度为 0.2603，测定孔吸光度为 0.2694，则计算如下：

$$\begin{aligned} \text{血清AKP活力 (金氏单位/100mL)} &= \frac{0.2694 - 0.0233}{0.2603 - 0.0233} \times 0.1 \times 100 \times 2 \\ &= 20.7679 \text{ 金氏单位/100mL} \end{aligned}$$

例 3：取 2%大鼠肝组织匀浆 5μL 进行 AKP 测定，空白管吸光度 0.0233，标准吸光度 0.2603，测定吸光度 0.0629。同时测定该 2%大鼠肝组织匀浆蛋白浓度为 3.528×10⁻³gprot/mL。测计算如下：

$$\begin{aligned} \text{大鼠肝组织AKP活力 (金氏单位/gprot)} &= \frac{0.0629 - 0.0233}{0.2603 - 0.0233} \times 0.1 \div (3.528 \times 10^{-3}) \\ &= 4.7361 \text{ 金氏单位/gprot} \end{aligned}$$

例 4：取 10%罗非鱼肝组织匀浆 5μL 进行 AKP 测定，空白管吸光度 0.0233，标准吸光度 0.2603，测定吸光度 0.1765。同时测定该 10%罗非鱼肝组织匀浆蛋白浓度为 4.1386×10⁻³gprot/mL。测计算如下：

$$\begin{aligned} \text{罗非鱼肝组织AKP活力 (金氏单位/gprot)} &= \frac{0.1765 - 0.0233}{0.2603 - 0.0233} \times 0.1 \div (4.138628 \times 10^{-3}) \\ &= 15.6191 \text{ 金氏单位/gprot} \end{aligned}$$

九、注意事项：

1、如果所用的酶标仪没有此波长，可以用相近的 510nm 或者 530nm 波长均可，且

- 510nm 波长测定结果相对 530nm 更好。
- 2、由于加样量比较少，建议加样时将吸头靠近酶标板底部，缓慢加样，边加边将吸头上移，以保证吸头上样本残留量最少，减少加样方面存在的误差。
 - 3、所加试剂接近于水剂，所以对吸头的黏附性很小，但加试剂时还是需要注意，速度不宜太快，以免溅出酶标孔外。
 - 4、加样或加试剂若靠壁加入则需靠近底部，前部分处理反应液量比较少，若靠近上端加样则会有部分黏附于酶标孔上端，从而造成反应不完全。
 - 5、酶标孔比较小，所以混匀力度要适中，太剧烈则可能将液体溅出，太慢则混匀不充分；先将孔壁上的液体轻轻的震动落下，再前后、左右的摇动。
 - 6、一般对于酶标板可能存在初始吸光度的差异，最好在使用之前先在相应的波长处测定其初始的吸光度，然后再加样测定。
 - 7、本试剂盒仅用于科研、实验室。
 - 8、正式实验前需要取 2 例预计差异最大的样本进行预试，若酶活力过高可将其稀释后 $A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 控制在 0.2 或 0.3 左右，若酶活力较低，则直接测定或加大一倍取样量后测定。

附录 I: 培养液及培养细胞中 AKP 测定

一、样本前处理:

1、**细胞培养液:** 吸取培养液, 1000-1500 转/分钟, 离心 10 分钟, 取上清液进行测定。

2、**培养细胞前处理:**

①、培养细胞的收集:

悬浮培养细胞: 可直接通过离心收集沉淀细胞 (1000 转/分钟, 离心 10 分钟, 弃上清留沉淀细胞)

贴壁培养的细胞: 吸去上清, 可通过细胞刮直接将细胞刮下; 或者是用 0.25% 的胰酶室温消化 2~3 分钟, 加培养液终止消化, 用微量移液器轻轻吹打, 将所有液体吸出转入 EP 管, 然后 1000 转/分钟, 离心 10 分钟弃上清, 留沉淀细胞, 再加入 1mL PBS 轻轻吹打, 再次 1000 转/分钟, 离心 10 分钟弃上清, 留沉淀细胞待用。如暂时不做, 则可以将细胞沉淀物低温冻存, 温度越低越好。

②、培养细胞的破碎:

研磨破碎: 在细胞沉淀中加入一定量 (10^6 的细胞一般加 0.3~0.5mL) 的缓冲液 (缓冲液可以用 PBS 或者是生理盐水), 用手动玻璃匀浆器冰水浴研磨 3~5 分钟, 或者是用电动研磨器冰水浴研磨 3 分钟待测;

超声破碎: 在细胞沉淀中加入一定量 (10^6 的细胞一般加 0.3~0.5mL) 的缓冲液 (缓冲液可以用 PBS 或者是生理盐水), 需保证超声探头在液面以下。功率 300W, 冰水浴, 每 3~5S 超声一次, 间隔 4 次 (每次间隔时间为 30S 左右)

化学裂解: 贴壁培养的细胞, 可直接将上清吸去后, 直接在孔板或是瓶中加入一定量的裂解液 (覆盖满细胞), 裂解 30~40 分钟 (可用显微镜观察细胞破碎情况), 再用微量移液器吸出待测。根据需要可用生理盐水或 PBS 进行一定的稀释。

二、操作表: (先将 0.1mg/mL 酚标准液用蒸馏水再 5 倍 (1:4) 稀释成 0.02mg/mL 酚标准液按下表操作)

	空白孔	标准孔	测定孔
双蒸水 (μL)	30		
0.02mg/mL 酚标准液 (μL)		30	
待测样本 (μL)			30
试剂一 (μL)	50	50	50
试剂二 (μL)	50	50	50
充分混匀 37°C 水浴 15 分钟			
试剂三 (μL)	150	150	150
轻轻振摇孔板混匀, 波长 520nm, 酶标仪测定各孔吸光度值			

三、计算公式及举例:

1、培养液的计算举例:

例: 取细胞培养液 30 μL 按照操作表进行 AKP 测定, 得空白孔吸光度为 0.0263, 标准孔吸光度为 0.3172, 测定孔吸光度为 0.2698, 则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{培养液中 AKP 活力} &= \frac{0.2698 - 0.0263}{0.3172 - 0.0263} \times 0.02 \times 100 \\ (\text{金氏单位}/100\text{mL}) &= 1.6741 \text{ 金氏单位}/100\text{mL} \end{aligned}$$

2、培养细胞的计算举例:

例: 12 孔板贴壁培养的成骨细胞, 吸去培养液后, 在孔板 中加入 0.2mL 裂解液 (1%

的 TritonX-100) 覆盖满细胞, 将细胞裂解后从中取 30 μ L 按照操作表进行 AKP 测定, 得空白孔吸光度为 0.0263, 标准孔吸光度为 0.3172, 测定孔吸光度为 0.1465, 同时用 BCA 法测定其蛋白浓度为 0.8546×10^{-3} gprot/mL, 则计算如下:

$$\begin{aligned} \text{培养细胞中 AKP 活力} &= \frac{0.1465 - 0.0263}{0.3172 - 0.0263} \times 0.02 \div (0.8546 \times 10^{-3}) \\ \text{(金氏单位/gprot)} &= 9.67 \text{ 金氏单位/gprot} \end{aligned}$$

附录 II： AKP 标准曲线制作

一、样本前处理：

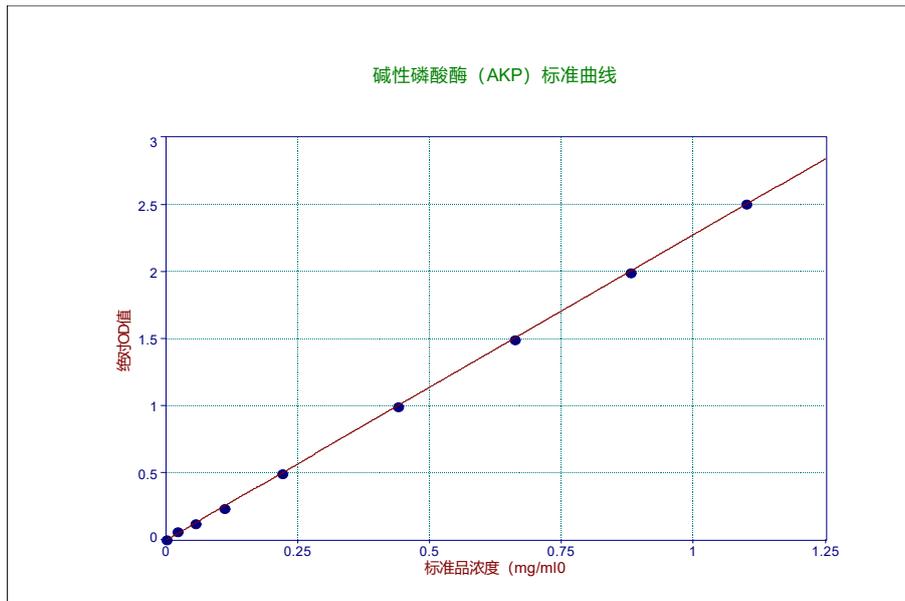
将标准品贮备液用蒸馏水 50 倍、20 倍、10 倍、5 倍、2.5 倍、1.25 倍稀释及原液操作（浓度为 0.022 mg/mL、0.055 mg/mL、0.11 mg/mL、0.22 mg/mL、0.44 mg/mL、0.88 mg/mL、1.1 mg/mL）

二、操作表：

	空白孔	标准孔
双蒸水 (μL)	5	
不同浓度的酚标准液 (μL)		5
试剂一 (μL)	50	50
试剂二 (μL)	50	50
轻轻振摇孔板混匀，37°C 振荡反应 15 分钟		
试剂三 (μL)	150	150
轻轻振摇孔板混匀，于波长 520nm，酶标仪测定吸光度值 A		

三、测定结果：

以所测得的绝对吸光度绝对 OD 值为纵坐标，以相应的标准品浓度单位为横坐标，绘制标准曲线。



标准曲线用户如果不做，按操作表操作后代入计算公式计算即可，不影响结果。