

碱性磷酸酶(AKP/ALP)试剂盒 (PNPP 法)

【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, EC3. 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。

【货 号】 TMC023

【规 格】 96T

【包装清单】

试剂名称	规格	保存条件	
提取液	液体110mL×1瓶	4℃	
试剂一	液体20mL×1瓶	-20℃	
试剂二	粉剂mg×2瓶	4℃	每瓶临用前加2.2mL试剂一，混匀待用，现配现用，一周内用完。
试剂三	液体3mL×1瓶	4℃	
标准品	粉剂mg×1支	4℃	若重新做标曲，则用到该试剂。

【保存条件】 4℃保存，有效期一年。

【操作步骤】 1、样本制备：

①组织样本：

称取约0.1g组织加入研钵中，加入1mL提取液，进行冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心10min，取上清液，置冰上待测。

注：也可以按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为1:5~10的比例提取。

②细菌/真菌样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心弃上清；取500万细菌或细胞加入1mL提取液；冰浴超声波破碎细菌或细胞(冰浴，功率20%或200W，超声3S，间隔10S，重复30次)；12000rpm，4℃离心10min，取上清液，置冰上待测。

注：也可按照细菌或细胞数量(10^4 个)：提取液体积(mL)为500~1000:1的比例进行提

取。

③液体样本:直接检测, 若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测:

①酶标仪预热30min以上, 调节波长到405nm。

②在96孔板中依次加入:

试剂名称(uL)	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℃水浴或恒温培养箱孵育15min		
试剂三	20	20
混匀, 在37℃下静置5min, 于405nm下读取吸光值A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

③标准曲线结果计算①由标准品测定获得, 如需重制见随货说明书或咨询。

3、结果计算:

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

②按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 37℃中每毫克蛋白每分钟水解 $1 \mu\text{mol}$ 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℃中每克组织每分钟水解 1mol 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 10^4 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℃中每毫升液体每分钟水解 $1 \mu\text{mol}$ 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)

- 【注意事项】**
- 1、样本制备完成后续放置冰上，且当天完成活性检测。
 - 2、若样品高于标准曲线范围，应当适量稀释样本，或者低于最低值，增加样本或者延长反应时间。
 - 3、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。
 - 4、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
-