

碱性磷酸酶活性检测试剂盒说明书

Cat#: 8013021

【产品名称】

碱性磷酸酶活性检测试剂盒

【包装规格】

| 成品名称 | 成品货号 | 规格 | 组分货号 | 组分名称 | 组分规格 | 数量 |
|--------------|---------|-------|-----------|----------------------|----------|-----|
| 碱性磷酸酶活性检测试剂盒 | 8013021 | 100 T | 8013021-1 | ALP Assay Buffer | 35 mL/瓶 | 1 瓶 |
| | | | 8013021-2 | pNPP Solution | 10 mL/瓶 | 1 瓶 |
| | | | 8013021-3 | pNP Standard (5 mM) | 500 µL/管 | 1 管 |
| | | | 8013021-4 | ALP Positive Control | 100 µL/管 | 1 管 |
| | | | 8013021-5 | ALP Stop Solution | 12 mL/瓶 | 1 瓶 |

【产品描述】

碱性磷酸酶活性检测试剂盒（Alkaline Phosphatase Activity Assay Kit）是一种灵敏简便的利用比色法检测碱性磷酸酶（Alkaline Phosphatase, ALP）活性的试剂盒。ALP 是一种广泛存在于生物机体中的磷酸酶，在碱性条件下催化磷酸酯水解释放无机磷酸，在骨骼矿化、糖酵解和氧化磷酸化中发挥重要作用。孕妇和处于生长发育期的儿童血清 ALP 活性较高，肝脏和骨骼疾病患者血清 ALP 活性会显著升高。ALP 常用于肝脏和骨骼疾病生物标志物。

ALP 可以催化对硝基苯磷酸（*p*-nitrophenyl phosphate, *p*NPP）脱磷酸生成对硝基苯酚（*p*-nitrophenol, *p*NP），*p*NP 在碱性条件下对 405nm 波长可见光具有最大吸收。因此，利用该反应可以通过测定生成 *p*NP 的吸光度定量检测 ALP 的活性。

反应示意图如下：



本试剂盒以 *p*NP 标准品和反应时间定量 ALP 酶活性，具有良好的检测线性，检测 ALP 线性范围为 6.25-200 mU/mL，灵敏度≤6.25 mU/mL。

本试剂盒能够检测血清、血浆、细胞裂解上清和组织匀浆上清中的 ALP 活性。

【储运条件】

2°C~8°C 储存，有效期 12 个月。

【需要而未提供的试剂及器材】

纯水

Triton X-100

细胞培养用 pH7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)

系列可调节量程移液器及吸头

干净的试管、离心管及 96 孔板

酶标仪

【操作说明】

1. 样品的准备

(1) 血浆样品的准备：取新鲜抗凝血液，4°C、1000 g 离心 10 分钟，上清为血浆。

(2) 血清样品的准备：取新鲜血液，室温凝固 30 分钟，4°C、2000 g 离心 15 分钟，上清为血清。

(3) 细胞裂解上清的准备：将需要测定的细胞(1×10^6 - 1×10^7)收集到 1.5 mL 的离心管中，4°C、300 g 离心 5 分钟，弃去上清，然后加入 200 μ L 的含 0.1% Triton X-100 的 PBS，冰浴裂解 30 分钟，4°C、10000 g 离心 10 分钟，收集上清。

(4) 组织裂解上清的准备：将需要测定的组织(20-50 mg)收集到玻璃匀浆器或自动匀浆管中，然后加入 500 μ L 的 PBS，匀浆 1 分钟，4°C、10000 g 离心 10 分钟，收集上清。

注：各种样品，如果不立即进行测定，请冻存于-80°C；正式测定前根据预实验结果，利用 ALP Assay Buffer 将样品适当稀释后进行测定，在正式检测前，需选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围稀释样本，一般血液样本建议稀释 2~5 倍。

2. 试剂盒的准备

本试剂盒 pNPP Solution 直接可作为检测工作液用于 ALP 测定，ALP Positive Control 需要利用 ALP Assay Buffer 稀释 100 倍后使用，即 10 μ L ALP Positive Control+990 μ L ALP Assay Buffer。

3. 标准品的准备

在 1.5 mL 离心管中，加入 900 μ L 的 ALP Assay Buffer，再取 100 μ L 的 5 mM 浓度 pNP Standard 加入离心管中配制 500 μ M 浓度 pNP Standard；然后再依次倍比稀释为 250、125、62.5、31.2、15.6、7.8 μ M 浓度，用于标准曲线测定。每次测定前重新配置标准品系列稀释液。

4. 测定方法

pNP 标准曲线测定：取 100 μ L 梯度浓度 pNP Standard (7.8-500 μ M)到 96 孔板中，最终 pNP 各孔加入量分别为 0、0.78、1.56、3.12、6.25、12.5、25、50 nmol。

样品测定：在 96 孔板中设置样品对照孔、样品孔和阳性对照孔；参考下表，首先在样品对照孔和样品孔中加入 10 μ L 的样品，阳性对照孔中加入 10 μ L 的经过稀释的 ALP Positive Control，然后在样品对照孔中加入 90 μ L 的 ALP Assay Buffer，样品孔和阳性对照孔中加入 90 μ L 的 pNPP Solution，混匀。

37°C反应 20 分钟，然后各孔加入 100 μ L 的 ALP Stop Solution，测定 405nm 波长的吸光度。

| | 标曲孔 | 样品对照孔 | 样品孔 | 阳性对照孔 |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 各浓度标准品 | 100 μ L | | | |
| 样品 | — | 10 μ L | 10 μ L | — |
| ALP Positive Control | — | — | — | 10 μ L |
| ALP Assay Buffer | — | 90 μ L | — | — |
| pNPP Solution | — | — | 90 μ L | 90 μ L |
| 37°C孵育 | 20 min | 20 min | 20 min | 20 min |
| ALP Stop Solution | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L |

注：注意缩短各样品之间加入的时间间隔及计时准确性；如果样品吸光度偏高，可适度稀释样品后测定；如果样品吸光度偏低，可适当延长反应时间或增加样品体积进行测定。

5. 数据处理

ALP 酶活性定义：在 37°C、pH 9.8 条件下，每分钟水解 1.0 μ mol 的 pNPP 为 pNP 的 ALP 为 1 U，1 U=1000 mU。

利用 pNP 标准品的量为横坐标，吸光度值为纵坐标制作标准曲线，并获得横纵坐标函数关系式，然后利用该标准曲线和各样品的吸光度值(样品孔-样品对照孔)计算样品中一定时

间段内产生的 pNP 量，从而换算为 ALP 酶活性。对于细胞和组织样品，可以根据样品中蛋白浓度测定，计算每毫克蛋白中 ALP 酶活性。

计算公式：ALP 酶活性(mU)= pNP 生成量(nmol)/反应时间(minutes)。酶活性浓度=酶活性/样品体积(mL)*样本稀释倍数

pNP 标准曲线测定如下图所示：

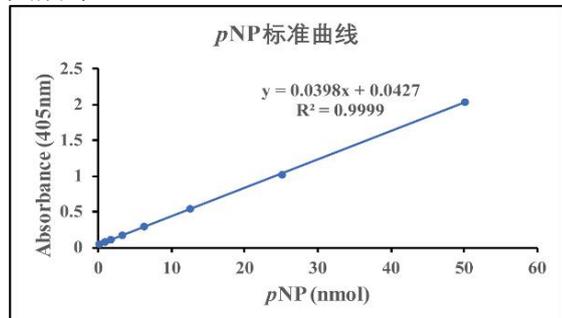


图 1 pNP 标准曲线

注：示例数据仅供参考，每次实验必须制备当次实验的标准曲线。

【注意事项】

1. 每次测定时利用标准品制作标准曲线。
2. 样品溶液中须避免出现 EDTA、氟离子、柠檬酸盐等碱性磷酸酶的抑制剂。
3. 初次使用试剂盒时，小体积液体试剂请适当离心后使用。
4. 本产品仅限专业人员用于科学研究，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

【产品标签符号说明】

| 产品标签符号 | 说明 | 产品标签符号 | 说明 |
|--------|--------|--------|------|
| REF | 产品编号 | LOT | 批次代码 |
| | 生产日期 | | 制造商 |
| | 有效期 | | 温度极限 |
| | 查阅使用说明 | | 避光保存 |

【说明书修改日期】

2024.09.04

【公司信息】

生产企业：北京行健雅生物技术有限公司(该产品由深圳市达科为生物工程有限公司监制)

网址：www.dakewe.com

电话：010-57794997

邮箱：xing_jianya@dakewe.net

地址：北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地华佗路 50 号院 1 号楼 301