

Alkaline Phosphatase Activity Detection Kit

碱性磷酸酶活性检测试剂盒

产品信息

产品名称	货号	规格	储存
Alkaline Phosphatase Activity Detection Kit 碱性磷酸酶活性检测试剂盒	21101ES60	100T	-20°C

产品描述

碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, 简称为 ALP 或 AKP), 又称碱性磷酸酯酶, 是一组同工酶, 目前已发现六种 ALP1-ALP6。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。碱性条件下可催化磷酸酯键的水解, 从而将底物分子上的磷酸基团去除, 转化为羟基。此类底物包括核酸(DNA、RNA)、蛋白、生物碱等。常见的有肠道碱性磷酸酶、非组织特异性碱性磷酸酶、胎盘碱性磷酸酶等; 生物学中碱性磷酸酶(ALP)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, 如: 1) 作为 iPS 成功诱导的标志; ALP 在大多数细胞类型中均有表达, 但是在 iPS 细胞内的表达水平明显升高; 2) 结肠癌细胞分化程度定性和定量的指标; 3) 血清中碱性磷酸酯酶的升高可导致高碱性磷酸酶血症, 常被认为和恶性胆管阻塞, 原发性硬化胆管炎, 肝癌, 肝硬化等肝胆疾病密切相关; 4) 血清中碱性磷酸酶活性升高还和骨骼损伤导致的骨生成, 以及骨骼疾病如纤维骨炎、佝偻病、成骨不全等密切相关; 5) 碱性磷酸酶水平也会出现一些病理性降低的情况, 多见于重症慢性肾炎、儿童甲状腺机能不全、贫血等。对于正常成人来说, 血清内 ALP 的范围为 40-150U/L。

对硝基苯磷酸(p-nitrophenyl phosphate, pNPP)是一种常用的磷酸酶显色底物, 碱性条件下, 可在 ALP 作用下生成对硝基苯酚(p-nitrophenol, pNP), 后者在碱性环境下呈黄色产物, 并在 405nm 处可检测到最大吸收峰。产物黄色越深, 说明 ALP 活性越高, 反之则活性越低。因此, 通过检测 OD₄₀₅ 吸光值即可计算 ALP 活性水平。

本品为碱性磷酸酶活性检测试剂盒, 可快速、便捷地检测细胞或组织裂解液/匀浆液、血清、血浆、尿液、纯化酶等样品中的 ALP 活性。该试剂盒包括标准品和空白对照, 可进行达 100 个样品的检测。

产品组分

组分编号	组分名称	产品规格 (100T)	储存方法
21101-A	ALP 反应缓冲液 ALP Assay Buffer	15ml	-20°C
21101-B	显色底物 pNPP Substrate	2 管	-20°C避光
21101-C	pNP 标准品溶液 p-nitrophenol Standard	100ul (10mM)	-20°C避光
21101-D	反应终止液 Stop Solution	12ml	-20°C

保存条件

冰袋运输。-20°C保存, 一年有效。其中显色底物、pNP 标准溶液需要避光保存。

注意事项

- 1) 如果进行酶活力的绝对定量, 进行酶反应时必须注意精确计时。此时推荐孵育 30min 等较长时间, 以减小操作过程中的时间误差。如果样品中酶活性较高, 则可以预先适当稀释样品。
- 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抑制剂。
- 3) ALP 反应缓冲液和 p-nitrophenol 标准品溶液对人体有害, 请注意适当防护。反应终止液有腐蚀性, 请小心操作。
- 4) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

1. 试剂准备

将所有试剂取出, 恢复至室温使用。

1) **显色底物溶液:** 取一管显色底物, 溶解于 2.5mL 的 ALP 反应缓冲液中, 充分溶解和混匀, 冰上放置。**注意:** 新鲜配制的显色底物溶液需在数小时 ($\leq 6h$) 内使用。

2) **标准品工作液:** 取 10 μ L p-nitrophenol 标准品溶液(10mM), 用 ALP 反应缓冲液稀释至 0.2mL, 使得终浓度为 0.5mM。

2. 样品准备

1) **细胞或组织裂解液:** 采用适当细胞或组织裂解液裂解细胞和组织, 如果有必要需进行适当匀浆, 随后离心取上清, 用于 ALP 活性的检测。

【注】: 裂解液中不能含有磷酸酶抑制剂。样品可以-80 $^{\circ}$ C冻存, 避免反复冻融。

2) **血浆、血清和尿液的准备:** 血浆和血清按照常规方法制备后可以直接用于本试剂盒的测定, 但为了消除样品本身颜色的干扰, 需设置加了血浆或血清但不加底物的对照。

【注】: 血浆制备不能含 EDTA 和柠檬酸盐的抗凝管。尿液通常也可以直接用于测定。上述样品可以-80 $^{\circ}$ C冻存, 避免反复冻融。

3) **样品的稀释:** 若样品中含有较高活性的 ALP, 可以使用原有的裂解液或 PBS 等进行稀释, 也可以采用试剂盒中的 ALP 反应缓冲液进行稀释。若使用上述反应缓冲液进行稀释, 需保留足够的缓冲液用于试剂盒的检测过程。

3. 加样

参考下表使用 96 孔板设置空白对照孔、标准品孔和样品孔。标准品的用量分别为 4、8、16、24、32 和 40 μ L, 样品通常可以直接加 50 μ L。如果样品中的碱性磷酸酶活性过高, 可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定。

表 1 各组分加样数据表

	空白对照 (Blank)	标准品 (Standard)	样品 (Sample)
ALP 反应缓冲液	50 μ L	(100-x) μ L	(50-y) μ L
显色底物	50 μ L	—	50 μ L
样品	—	—	y μ L
标准品工作液	—	x μ L	—

4. **混匀:** 用枪头轻轻吹打混匀, 也可借助摇床进行混匀。

5. **孵育:** 37 $^{\circ}$ C 孵育 5-10min。(待测样品中 ALP 活性较低时, 可适当延长孵育时间至 30min)

6. **终止:** 每孔加入 100 μ L 反应终止液终止反应。此时, 标准品或有 ALP 活性的孔会呈现不同深浅的黄色。

7. **检测:** 405nm 测定吸光度。如果不能测定 405nm, 也可以在 400-415nm 范围内检测吸光度。如果不能立即测定, 可以在数小时内完成测定, 所显现的黄色在数小时 ($\leq 6h$) 内稳定。

8. 结果分析

碱性磷酸酶活性单位的定义: 在 pH9.8 的二乙醇胺 (diethanolamine, DEA) 缓冲液中, 37 $^{\circ}$ C 条件下, 每分钟水解 pNPP 显色底物产生 1 μ M p-nitrophenol 所需的 ALP 量定义为一个酶活力单位, 也被称作一个 DEA 酶活力单位。在 pH9.6 的甘氨酸缓冲液中, 25 $^{\circ}$ C 条件下, 每分钟水解 pNPP 显色底物产生 1 μ M p-nitrophenol 所需的 ALP 量定义为一个酶活力单位, 也被称作一个甘氨酸酶活力单位。一个甘氨酸酶活力单位约相当于 3 个 DEA 酶活力单位。本试剂盒测定的是 DEA 酶活力单位。**最后, 根据酶活性单位的定义, 计算出样品中的碱性磷酸酶活性。**