

M5 Alkaline Phosphatase Activity Detection Kit 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Alkaline Phosphatase Activity Detection Kit	100T	MF801-01

【储存条件】

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

【产品简介】

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。

【自备试剂】

无水乙醇，0.9% NaCl。

【产品组份】

	100 T
ALP 反应缓冲液 ALP Assay Buffer	15 ml
显色底物 pNPP Substrate	2 vials(避光)
pNP 标准品溶液 p-nitrophenol Standard	100μl (10mM) (避光)
反应终止液 Stop Solution	12 ml

【实验前准备及重要注意事项】

- 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。

【操作步骤】

一、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。

二、样品准备

- 1) 细胞或组织裂解液的准备：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。注意：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。注意：血浆制备不能用含 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。

三、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	—

四. 混匀：用枪头轻轻吹打混匀，也可借助摇床进行混匀。

五. 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)

六. 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。

七. 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。

八. 结果分析：根据酶活性单位的定义，计算出样品中的碱性磷酸酶活性。

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。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。