

碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(磷酸苯二钠微板法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介：

碱性磷酸酶(Alkalinephosphatase, 简称 ALP 或 AKP)为一类磷酸酯酶，广泛分布于哺乳动物组织内，其活性所需最适 pH9.2~9.8。此酶主要存在于物质交换活跃之处(细胞膜)，如肠上皮和肾近曲小管的刷状缘、附睾上皮之静纤毛、肝的毛细胆管膜以及微动脉和毛细血管动脉部之内皮，还见于内质网、高尔基复合体、吞饮小泡、肠上皮之溶酶体、中性粒细胞之中性颗粒以及平滑肌的细胞膜。

碱性磷酸酶检测试剂盒(磷酸苯二钠微板法)(AlkalinePhosphataseColorimetricAssayKit)采用磷酸苯二钠比色法，其检测原理是磷酸苯二钠在碱性条件下，可在碱性磷酸酶的作用下生成游离酚和磷酸，在碱性条件下酚与氨基安替比林结合，并经氧化生成红色醌式结构物，呈深浅不一的红色，产物红色越深说明碱性磷酸酶活性越高，反之则酶活性越低，通过酶标仪测定510nm处吸光度，据此通过比色分析就可以计算出碱性磷酸酶活性水平。该试剂盒可用于检测细胞或组织的裂解液或匀浆液、血浆、血清等样品中内源性的碱性磷酸酶活性。该试剂盒仅用于科研领域，不宜用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

名称	规格		保存条件
碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒	50T	100T	4℃
试剂(A):ALP Assay Buffer	25ml	50ml	4℃避光
试剂(B):ALP 显色液	25ml	50ml	4℃避光
试剂(C):显色基液	25ml	50ml	4℃避光
试剂(D):Phenol 标准(1mg/ml)	2ml	2ml	4℃避光
使用说明书	1 份		
有效期	6 个月		

自备材料：

- 1、离心管或小试管、水浴锅或恒温箱
- 2、酶标仪、96 孔板
- 3、ddH₂O、PBS 或生理盐水

操作步骤(仅供参考):

1、准备样品:

①细胞或组织样品: 取恰当细胞或组织裂解液, 如果有必要可用 PBS 或生理盐水进行适当匀浆, 一般细胞数量在 10^6 以上, 组织应在 100mg 以上, 3000~4000rpm 离心取上清, -20°C 冻存, 用于碱性磷酸酶的检测。

②血浆、血清和尿液样品: 血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于本试剂盒的测定, 尿液通常也可以直接用于测定, -20°C 冻存, 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。

③高活性样品: 如果样品中含有较高活性的碱性磷酸酶, 可以使用原有的裂解液或 PBS 等进行稀释, 如鸡血清、血浆可稀释 5~10 倍后检测。

2、配制标准品工作液: 取出 Phenol 标准(1mg/ml)恢复至室温后, 取 0.1ml 溶解于 1.9ml ddH₂O, 即为标准品工作液-Phenol(0.05mg/ml)。按照下表稀释系列标准品溶液。

加入物(μl)	0	1	2	3	4	5	6
Phenol(0.05mg/ml)	0	5	10	20	30	40	50
ddH ₂ O	55	50	45	35	25	15	5
相当于金氏单位(U/L)	0	5	10	20	30	40	50

3、ALP 加样: 按照下表设置对照孔、标准孔、测定孔, 溶液应按照顺序依次加入, 并注意避免产生气泡。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, 样品的检测最好能设置平行孔。

加入物(μl)	对照孔	标准孔	测定孔
Phenol 标准(0~6 号)	—	55	—
待测样品	—	—	55
ALP Assay buffer	50	50	50
37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 5min。			
ALP 显色液(37 $^{\circ}\text{C}$ 提前温育)	50	50	50
立即混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中准确孵育 15min。			
显色基液	50	50	50
ddH ₂ O	100	100	100
待测样品	55	—	—

4、ALP 测定: 0 号孔(ddH₂O)调零, 酶标仪测定对照孔、标准孔、测定孔 510nm 吸光度(即为 A 对照、A 标准、A 测定), 详见附录。

计算: 碱性磷酸酶金氏活性单位的定义: 在 37℃条件下, 100ml 待测样品与显色底物(即 ALP 显色液所含物质)作用 15min, 产生 1mg 酚为一个金氏单位。

以系列 Phenol 标准(1~6 号)对应的金氏单位(5、10、20、30、40、50U/L)为横坐标, 以相应的 A 标准(1~6 号)为纵坐标, 绘制标准曲线。以 A 测定-A 对照的差值为实际的吸光度, 用该差值与标准曲线进行对比, 求出酶活力单位。

参考区间(37℃):

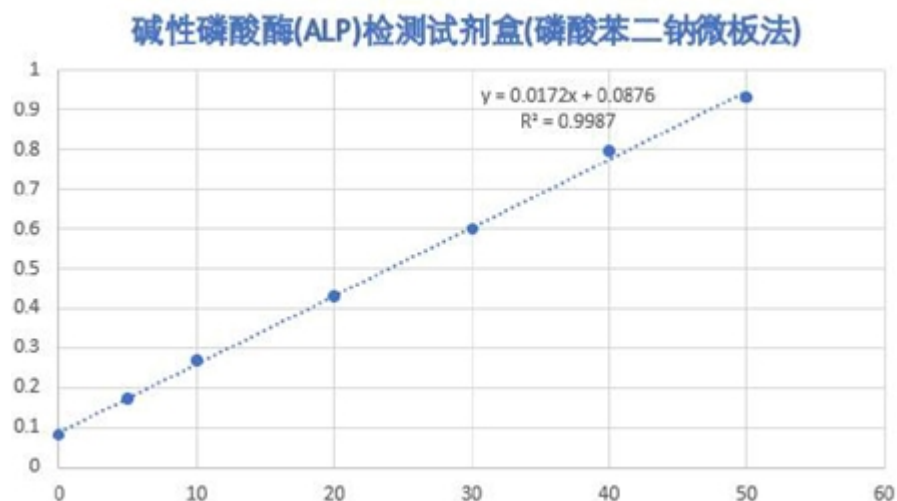
健康成年人 3~13 金氏单位

健康儿童 5~28 金氏单位

注意事项:

- 1、待测样品中不能含有磷酸酶抑制剂, 同时需避免反复冻融。
- 2、如果没有酶标仪, 也可以使用分光光度计测定, 但应注意 96 孔板最大检测体积。
- 3、所测样品的值高于标准曲线的上限, 应稀释样品后重新测定。
- 4、空白孔如果显红色, 说明 ALP 显色液不可用, 应丢弃。
- 5、加入显色基液时应迅速, 并且及时混匀, 否则显色不充分。
- 6、如无法检测 510nm, 亦可检测 500~530nm 范围内吸光度。
- 7、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

附录: 参考标准曲线范围: 测定 Phenol 标准在 5~50U/L 金氏单位时, 通过酶标仪 505nm 测定其吸光度多在 0.1~1.0 之间, 标准曲线参考如下:



注意: 由于检测仪器和操作手法等条件的不同, 参考值范围会有波动, 该值仅供参考, 对于要求精确计算 ALP 含量的, 可以进行多点重复测定。根据测定经验显示, 标准品浓度在 5U/L 以下, 标准品浓度在 100U/L 以上, 标准曲线会有偏差。