

Alkaline Phosphatase Assay Kit

碱性磷酸酶检测试剂盒

产品编号	产品名称	规格
BL1428A	碱性磷酸酶检测试剂盒	100T

产品简介:

磷酸酶是一种重要的水解酶。碱性磷酸酶（AKP/ALP）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。AKP 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。生物学中 AKP 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。

本试剂盒提供一种高灵敏度，简单，直接的检测方法，可用于检测细胞或组织的裂解液或匀浆液、血浆、血清、尿液等样品中内源性的碱性磷酸酶活性。工作原理是：磷酸对硝基苯酯（pNPP）作为底物，在酸性条件下，通过碱性磷酸酶的作用生成 *p*-nitrophenol；在碱性条件下 *p*-nitrophenol 转变成醌式结构，呈较深的黄色，该产物在 405nm 处有最大吸收峰。产物颜色越深，说明 ALP 活性越高，反之则活性越低。

产品组成:

编号	试剂名称	规格
BL1428A-1	检测缓冲液	15 mL
BL1428A-2	显色底物	2 支
BL1428A-3	<i>p</i> -nitrophenol 溶液(10 mM)	0.1 mL
BL1428A-4	反应终止液	15 mL

使用方法:

1. 试剂准备:

将所有试剂取出，恢复至室温使用。

a. 显色底物溶液:

请取一支显色底物，溶解于 2.5 mL 的检测缓冲液中（可先用 1 mL 检测缓冲液进行溶解，充分溶解和混匀后，转移至 15 mL 离心管，再加入 1.5 mL 检测缓冲液），充分溶解和混匀，冰上放置。新鲜配制的显色底物溶液需在 6 小时内使用。

b. 标准品工作液:

取 10 μ L *p*-nitrophenol 溶液(10 mM)，用检测缓冲液稀释至 0.2 mL，最终浓度为 0.5 mM。

2. 样品准备:

a. 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或组织，建议使用 Biosharp 的 BL1322A Western 及 IP 细胞裂解液（无抑制剂）裂解相关样品。如果有必要可用 PBS 或生理盐水需进行适当匀浆，随后离心取上清，用于碱性磷酸酶的检测。

注意：裂解液中不能含有磷酸酶抑制剂。样品可以-80°C冻存，但需避免反复冻融。

b. 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。血浆制备时不能用含 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°C冻存，但需避免反复冻融。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



c. 样品的稀释:

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, 也可以采用试剂盒中的检测缓冲液进行稀释。如果使用试剂盒中提供的检测缓冲液进行稀释, 需注意保留足够的检测缓冲液用于试剂盒的检测过程。

3. 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 μL , 样品通常可以直接加 50 μL 。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。

	空白对照(Blank)	标准品(Standard)	样品(Sample)
检测缓冲液	50 μL	(100-x) μL	(50-y) μL
显色底物	50 μL	—	50 μL
样品	—	—	y μL
标准品工作液	—	x μL	—

4. 用枪头轻轻吹打混匀, 也可借助摇床进行混匀。

5. 37°C 孵育 5-10 分钟。(说明: 待测样品中碱性磷酸酶活性较低时, 可适当延长孵育时间至 30 分钟)

6. 每孔加入 100 μL 反应终止液终止反应。此时, 标准品或有碱性磷酸酶活性的孔会呈现不同深浅的黄色。

7. 在 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内稳定。

8. 碱性磷酸酶活性单位的定义: 在 pH9.8 的 diethanolamine(DEA)缓冲液中, 37°C 条件下, 每分钟水解 para-nitrophenyl phosphate 显色底物产生 1 微摩尔 *p*-nitrophenol 所需的碱性磷酸酶的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°C 条件下, 每分钟水解 para-nitrophenyl phosphate 显色底物产生 1 微摩尔 *p*-nitrophenol 所需的碱性磷酸酶的量定义为一个酶活力单位, 也被称作一个 Glycine 酶活力单位。一个 Glycine 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。

9. 根据酶活性定义, 计算出样品中的碱性磷酸酶活性。

注意事项:

- 1、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。
- 2、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期:

-20°C 保存, 一年有效。其中显色底物和 *p*-nitrophenol 溶液需避光保存。

