

Alkaline Phosphatase Activity Detection Kit

碱性磷酸酶 ALP 活性检测试剂盒

Technical literature is available at: www.mesgenbio.com. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com



产品编号: MG88021

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。

试剂盒组成

产品组成	MG88021-50T	MG88021-100T	MG88021-200T
ALP Assay Buffer	7.5ml	15ml	30ml
pNPP Substrate	1管	2管	4管
p-nitrophenol Standard	50ul (10mM)	100ul (10mM)	200ul (10mM)
Stop Solution	6ml	12ml	24ml

储存条件

各组分均-20°C保存, pNPP Substrate和p-nitrophenol Standard避光保存, 有效期1年。

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。

操作方法

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。
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。

	空白对照 (Blank)	标准品 (Standard)	样品 (Sample)
ALP Assay Buffer	50 μ l	(100-x) μ l	(50-y) μ l
显色底物溶液	50 μ l	-	50 μ l
样品	-	-	y μ l
标准品工作液	-	x μ l	-

表 1 各组分加样数据表

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。

仅供科学研究, 不得用于临床治疗