碱性磷酸酶同工酶检测试剂盒(热稳定性法)

产品简介:

碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase，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 pH 9.2~9.8，碱性磷酸酶同工酶有肝、骨、小肠、胎盘、胆汁等同工酶。

碱性磷酸酶同工酶检测试剂盒(热稳定性法)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，通过比色法(分光光度计或酶标仪)测定510nm 处吸光度，据此通过比色分析就可以计算出总的碱性磷酸酶活性水平，同时通过56℃、65℃加热后测定残余 ALP 活性，以确定同工酶的性质，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同工酶活性；如果用分光光度计，100T 的检测试剂盒可检测 25 次左右；如果用酶标仪，100T 的检测试剂盒可检测 250 次左右。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTE0009 100T	Storage
试剂(A): Phenol 标准(1mg/ml)	2ml	4℃ 避光
试剂(B): ALP Assay Buffer	50ml	4℃ 避光
试剂(C): 磷酸苯二钠试剂	50ml	4℃ 避光
试剂(D): ALP 显色试剂 A	50ml	4℃ 避光
试剂(E): ALP 显色试剂 B	100ml	RT
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、离心管或 96 孔板、水浴锅或恒温箱、分光光度计或酶标仪

2、ddH_2O 、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℃冻存，用于碱性磷酸酶同工酶的检测。

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该试剂盒的测定，尿液通常也可以直接用于测定，-20℃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 ALP 显色试剂：临用前将 ALP 显色试剂 A 和 ALP 显色试剂 B 按 1:2 比例混合即可，不宜长期保存。

3、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 ddH_2O，即为 Phenol 标准(0.05mg/ml)，按照下表稀释系列标准品溶液。

加入物(ml)	0	1	2	3	4	5	6
Phenol(0.05mg/ml)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
ddH_2O	0.55	0.50	0.45	0.35	0.25	0.15	0.05
相当于金氏单位(U/L)	0	5	10	20	30	40	50

4、分光光度计测定：

(1)检测总 ALP：按照下表设置对照管、标准管、测定管，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酯酶活性过高，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管。

加入物(ml)	对照管	标准管	测定管
Phenol 标准(1～5 号管)	—	0.55	—
待测样品	—	—	0.55
ALP Assay Buffer	0.50	0.50	0.50
37℃水浴中孵育 5min。			
磷酸苯二钠试剂(37℃提前温育)	0.50	0.50	0.50
立即混匀，37℃水浴中准确孵育 15min。			
ALP 显色试剂	1.50	1.50	1.50
待测样品	0.55	—	—

(2)检测 ALP 同工酶：取相同样本，分别置于 56℃和 65℃水浴，准确孵育 10min，期间不断晃动使温度尽快平衡，然后立即冰浴至室温，其余操作同上。

用分光光度计，以 0 号管(ddH_2O)调零，读取对照管、标准管、测定管的 510nm 吸光度(即 $A_{对照}$、$A_{标准}$、$A_{测定}$)，如无法检测 510nm，亦可检测 500～530nm 范围内吸光度。

5、酶标仪测定：

(1)检测总 ALP：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酯酶活性过高，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(1～5 号管)	—	55	—
待测样品	—	—	55
ALP Assay buffer	50	50	50
37℃水浴中孵育 5min。			
ALP 显色液(37℃提前温育)	50	50	50
立即混匀，37℃水浴中准确孵育 15min。			
显色基液	150	150	150
待测样品	55	—	—

(2)检测 ALP 同工酶：取相同样本，分别置于 56℃和 65℃水浴，准确孵育 10min，期间不断晃动使温度尽快平衡，然后立即冰浴至室温，其余操作同上。

用酶标仪，以 0 号孔(ddH_2O)调零，读取对照孔、标准孔、测定孔的 510nm 吸光度(即 $A_{对照}$、$A_{标准}$、$A_{测定}$)，如无法检测 510nm，亦可检测 500～530nm 范围内吸光度。

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(U/L)。

以系列 Phenol 标准(1～5 号管)对应的金氏单位为 x 轴，以相应的 $A_{标准}$(1～5 号管)为 y 轴，绘制标准曲线，亦可分别制作标准曲线。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，求出总 ALP、56℃加热后 ALP、65℃加热后 ALP 活性单位。

56℃加热后 ALP 残余活性百分率=56℃加热后 ALP 残余活性/总 ALP 活性×100%

65℃加热后 ALP 残余活性百分率=65℃加热后 ALP 残余活性/总 ALP 活性×100%

参考区间(37℃):

健康成年人总 ALP	3～13 金氏单位
健康儿童总 ALP	5～28 金氏单位

加热后 ALP 残余活性百分率

来源	56℃	65℃
骨	0.19~5%	0
肝	1.77~8%	0
肠	69.5~81.3%	0~0.95%
胎盘	90.7~99%	87~94%

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、 如果没有分光光度计，也可以使用酶标仪测定。
3、 所测样本的值高于标准曲线的上限，应稀释样品后重新测定。
4、 空白管如果显红色，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、 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： 6 个月有效；低温运输，按要求保存。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCCC0007	磷酸缓冲盐溶液(10×PBS,无钙镁)
GCCS0001	ACK 红细胞裂解液(ACK Lysis Buffer)
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDF0135	组织细胞固定液(4% PFA)
GCNR0001	DEPC 处理水(0.1%)
GCPS0013	RIPA 裂解液(强)
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)