

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

碱性磷酸酶活性测定试剂盒 Alkaline Phosphatase (ALP) Activity Assay Kit

产品货号: BC00046

产品规格: 100T

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们:

✉ 邮箱 (销售) order@enkilife.cn

✉ 邮箱 (技术支持) tech@enkilife.cn

☎ 公司电话 027-87002838

🌐 网址 www.enkilife.cn



订阅微信公众号
获取更多技术
信息及前沿动态

保质期: 请见试剂盒外包装标签。

技术支持: 为了更好地给您提供服务, 联系时请告知产品外包装标签上批号。

基本信息

产品中文名称	碱性磷酸酶活性测定试剂盒
产品英文名称	Alkaline Phosphatase (ALP) Activity Assay Kit
检测方法	Colorimetric
样品类型	血清、血浆、尿液、细胞、组织
检测类型	Enzyme activity
检测仪器及波长	酶标仪（400-415 nm，最佳检测波长 405nm）

产品简介

碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, AP/ALP/AKP/ALKP/ALPase/Alk Phos)也称碱性磷酸酯酶(EC 3.1.3.1), 可以在碱性条件下催化磷酸酯键的水解。哺乳动物中, 肝脏、胆管、肾脏、骨头和胎盘中的碱性磷酸酶活性比较高。常见的碱性磷酸酶包括肠道碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, intestinal, ALPI)、非组织特异性碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme, ALPL)和胎盘碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, placental type, 也称 placental alkaline phosphatase, PLAP)。除胎盘碱性磷酸酶(alkaline phosphatase placental isoform)以外, 其它的内源性碱性磷酸酶加热后易失活。常见的小牛肠碱性磷酸酶(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, CIAP/CIP)被广泛用于二抗等的标记最终用于蛋白和核酸等的检测, 也常用于 DNA 或 RNA 5'和 3'末端的去磷酸化(去单磷酸化), 特别是质粒的 5'末端去磷酸化以避免质粒自连等。

干细胞, 如 iPS 中, 碱性磷酸酶的活性很高, 常被用作 iPS 成功诱导的标志。另外, 分化的结肠癌细胞中碱性磷酸酶的活性也会显著升高, 被当作结肠癌细胞分化程度定性和定量的指标。此外, 血清中碱性磷酸酯酶的升高, 被称作高碱性磷酸酶血症 (hyperalkaline phosphatasemia), 被认为和恶性胆管阻塞(malignant biliary obstruction)、原发性胆管硬化(primary biliary cirrhosis)、原发性硬化胆管炎(primary sclerosing cholangitis)、肝淋巴瘤(hepatic lymphoma)和肝肉瘤(hepatic sarcoidosis)等肝胆疾病密切相关。血清中碱性磷酸酶活性升高还和骨头生成密切相关, 因为碱性磷酸酶是成骨细胞的副产物。血清中碱性磷酸酶活性过低也和一些疾病相关。儿童和孕妇血清中的碱

性磷酸酶活性较普通人高一些。血清中碱性磷酸酶活性范围在 20-140U/L。

检测原理

对硝基苯磷酸二钠 (Para-nitrophenyl phosphate, pNPP) 是一种常用的磷酸酶显色底物，在碱性条件下，可在碱性磷酸酶作用下生成对硝基苯酚(Para-nitrophenol, pNP)。p-nitrophenol 在碱性条件下，呈黄色产物，可以在 400-415nm 检测吸光度。产物黄色越深，说明碱性磷酸酶活性越高，反之则酶活性越低。据此通过比色分析就可以计算出碱性磷酸酶活性水平。

产品组分

编号	产品名称	包装规格 (100T)	保存方式
试剂一	检测缓冲液	15ml	-20℃
试剂二	显色底物	2 管	-20℃，需避光保存。
试剂三	p-nitrophenol 溶液(10mM)	0.1ml	-20℃，需避光保存。
试剂四	反应终止液	12ml	-20℃
耗材一	96 孔酶标板	1 板	RT
耗材二	96 孔覆膜	2 张	RT

保存条件

未拆封的试剂盒可在 -20℃保存 12 个月。

实验前准备

• 样品处理

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或组织，如果有必要需进行适当匀浆，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℃ 冻存，但需避免反复冻融。
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。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℃冻存，但需避免反复冻融。

- 3. 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。

• 试剂盒的准备工作

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 的检测缓冲液中(可先用 1ml 检测缓冲液进行溶解，充分溶解和混匀后，转移至 15ml 离心管，再加入 1.5ml 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。
- 2. 标准品工作液：取 10μl *p*-nitrophenol 溶液(10mM)，用检测缓冲液稀释至 0.2ml，最终浓度为 0.5mM。

操作流程

- 1. 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 微升，样品通常可以直接加 50 微升。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	50μl	(100-x) μl	(50-y) μl
显色底物	50μl	--	50μl
样品	--	--	yμl
标准品工作液	--	xμl	--

- 2. 用枪头轻轻吹打混匀，也可借助摇床进行混匀。
- 3. 37℃ 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)

4. 每孔加入 100 μ l 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。
5. 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。

结果计算

1. 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。
2. 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. 如果希望进行酶活性的绝对定量，进行酶反应时必须注意精确计时。此时推荐采用孵育 30 分钟等较长的时间，以减小操作过程中的时间误差。同时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的抑制剂。
3. 检测缓冲液和 *p*-nitrophenol 溶液对人体有害，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。反应终止液有腐蚀性，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或腐蚀其他物品。
4. 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，不得存放于普通住宅内。