

## 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。

Biorigin 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°C、65°C 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:

| 名称                       | 编号 | BN27207 | Storage |
|--------------------------|----|---------|---------|
|                          |    | 100T    |         |
| 试剂(A): Phenol 标准(1mg/ml) |    | 2ml     | 4°C 避光  |
| 试剂(B): ALP Assay Buffer  |    | 50ml    | 4°C 避光  |
| 试剂(C): 磷酸苯二钠试剂           |    | 50ml    | 4°C 避光  |
| 试剂(D): ALP 显色试剂 A        |    | 50ml    | 4°C 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<sub>2</sub>O、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<sup>6</sup> 以上, 组织应在 100mg 以上, 3000~4000rpm 离心取

本产品仅用于科研

上清, -20°C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°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 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<sub>2</sub>O, 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 <sub>2</sub> O | 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检测, 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°C水浴中孵育 5min。          |      |      |      |
| 磷酸苯二钠试剂(37°C提前温育)        | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| 立即混匀, 37°C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°C和 65°C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<sub>2</sub>O)调零, 读取对照管、标准管、测定管的 510nm 吸光度 (即  $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ ), 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

本产品仅用于科研

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°C水浴中孵育 5min。         |     |     |     |
| ALP 显色液(37°C提前温育)       | 50  | 50  | 50  |
| 立即混匀，37°C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°C和 65°C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<sub>2</sub>O)调零，读取对照孔、标准孔、测定孔的 510nm 吸光度(即 A<sub>对照</sub>、A<sub>标准</sub>、A<sub>测定</sub>)，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°C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<sub>标准</sub>(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<sub>测定</sub>-A<sub>对照</sub>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°C加热后 ALP、65°C加热后 ALP 活性单位。

$$56^{\circ}\text{C加热后 ALP 残余活性百分率} = \frac{56^{\circ}\text{C加热后 ALP 残余活性}}{\text{总 ALP 活性}} \times 100\%$$

$$65^{\circ}\text{C加热后 ALP 残余活性百分率} = \frac{65^{\circ}\text{C加热后 ALP 残余活性}}{\text{总 ALP 活性}} \times 100\%$$

### 参考区间(37°C)：

|            |           |
|------------|-----------|
| 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°C       | 65°C    |
| 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%  |

本产品仅用于科研

**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。