

碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(磷酸苯二钠比色法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介：

碱性磷酸酶(Alkalinephosphatase, 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 pH9.2~9.8。此酶主要存在于物质交换活跃之处(细胞膜)，如肠上皮和肾近曲小管的刷状缘、附睾上皮之静纤毛、肝的毛细胆管膜以及微动脉和毛细血管动脉部之内皮，还见于内质网、高尔基复合体、吞饮小泡、肠上皮之溶酶体、中性粒细胞之中性颗粒以及平滑肌的细胞膜。

碱性磷酸酶检测试剂盒(磷酸苯二钠比色法)(AlkalinePhosphataseColorimetricAssayKit)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，通过分光光度比色法测定 510nm 处吸光度，据此通过比色分析就可以计算出碱性磷酸酶活性水平。该试剂盒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酶活性。该试剂盒仅用于科研领域，不宜用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

名称	规格		保存条件
碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒	50T	100T	4℃ 避光
试剂(A): ALP Assay Buffer	25ml	50ml	4℃ 避光
试剂(B): ALP 显色液	25ml	50ml	4℃ 避光
试剂(C): 显色基液	25ml	50ml	4℃ 避光
试剂(D): Phenol 标准(1mg/ml)	2ml	2ml	4℃ 避光
使用说明书	1 份		
有效期	6 个月		

自备材料：

- 1、离心管或小试管、水浴锅或恒温箱
- 2、分光光度计、比色杯
- 3、ddH₂O、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 10⁶ 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本试剂盒的测定, 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 ddH₂O, 即为标准品工作液-Phenol(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 ₂ 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

3、ALP 加样: 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(0~6 号管)	—	0.55	—
待测样品	—	—	0.55
ALP Assay Buffer	0.5	0.5	0.5
37℃ 水浴中孵育 5min。			
ALP 显色液(37℃ 提前温育)	0.5	0.5	0.5
立即混匀, 37℃ 水浴中准确孵育 15min。			
显色基液	0.5	0.5	0.5
ddH ₂ O	1	1	1
待测样品	0.55	—	—

4、ALP 测定: 以 0 号管(ddH₂O)调零, 比色杯光径 1cm, 分光光度计测定对照管、标准管、测定管 510nm 吸光度(即为 A 对照、A 标准、A 测定), 详见附录。

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。

以系列 Phenol 标准(1~6 号)对应的金氏单位(10、20、30、40、50U/L)为横坐标,以相应的 A 标准(1~6 号)为纵坐标,绘制标准曲线。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,求出酶活力单位。

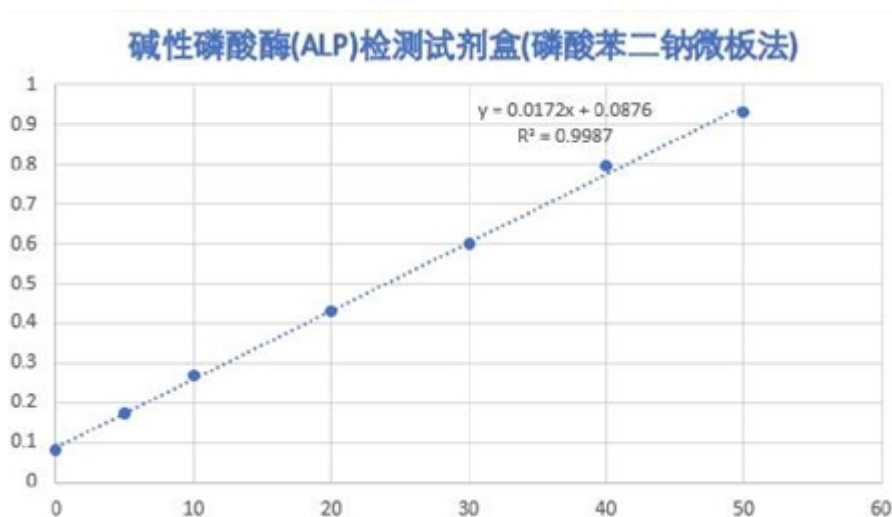
参考区间(37℃):

健康成年人	3~13 金氏单位
健康儿童	5~28 金氏单位

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,但应注意 96 孔板最大检测体积。
- 3、所测样品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、如无法检测 510nm,亦可检测 500~530nm 范围内吸光度。
- 7、为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

附录: 参考标准曲线范围:测定 Phenol 标准在 5~50U/L 金氏单位时,通过酶标仪 505nm 测定其吸光度多在 0.1~1.0 之间,标准曲线参考如下:



注意: 由于检测仪器和操作手法等条件的不同,参考值范围会有波动,该值仅供参考,对于要求精确计算 ALP 含量的,可以进行多点重复测定;根据测定经验显示,标准品浓度在 5U/L 以下,标准品浓度在 100U/L 以上,标准曲线会有偏差。