

碱性磷酸酶同工酶检测试剂盒(抑制敏感法)

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pH9.2~9.8, 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(抑制敏感法)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; 同时通过尿素、苯丙氨酸抑制后测定残余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酶同工酶活性; 如果用分光光度计, 100T的检测试剂盒可检测33次左右; 如果用酶标仪, 100T的检测试剂盒可检测330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	ADS006TE0 100T	Storage
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
试剂(F): 尿素抑制剂	4ml	4°C
试剂(G): 苯丙氨酸抑制剂	4ml	4°C
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、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 10^6 以上，组织应在100mg以上，3000~4000rpm离心取上清， -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 ddH₂O，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 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

4、分光光度计测定(检测总ALP)：按照下表设置对照管、标准管、尿素测定管、苯丙测定管、总ALP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同工酶的活性过高，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	尿素测定管	苯丙测定管	总ALP测定管
Phenol 标准(1~6号管)	—	0.2	—	—	—
待测样品	—	—	0.1	0.1	0.1
尿素抑制剂	—	—	0.1	—	—
苯丙氨酸抑制剂	—	—	—	0.1	—
生理盐水	—	—	—	—	0.1
ALP Assay Buffer	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
37°C水浴中孵育 5min。					
磷酸苯二钠试剂(37°C提前温育)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
立即混匀，37°C水浴中准确孵育 15min。					
ALP 显色试剂	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

待测样品	0.2	—	—	—	—
------	-----	---	---	---	---

以0号管(ddH₂O)调零, 比色杯光径1cm, 以分光光度计测定对照管、标准管、尿素测定管、苯丙测定管、总ALP测定管510nm处吸光度(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, 一般应15min内检测完毕。

- 5、酶标仪测定(检测总ALP): 按照下表设置对照孔、标准孔、尿素测定孔、苯丙测定孔、总ALP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	尿素测定孔	苯丙测定孔	总 ALP 测定孔
Phenol 标准(1~6号管)	—	20	—	—	—
待测样品	—	—	10	10	10
尿素抑制剂	—	—	10	—	—
苯丙氨酸抑制剂	—	—	—	10	—
生理盐水	—	—	—	—	10
ALP Assay Buffer	50	50	50	50	50
37°C水浴中孵育 5min。					
磷酸苯二钠试剂(37°C提前温育)	50	50	50	50	50
立即混匀, 37°C水浴中准确孵育 15min。					
显色基液	150	150	150	150	150
待测样品	20	—	—	—	—

以0号管(ddH₂O)调零, 酶标仪测定对照孔、标准孔、尿素测定孔、苯丙测定孔、总ALP测定孔510nm处吸光度(即 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$), 其中 $A_{\text{测定}}$ 是指尿素测定管/孔、苯丙测定管/孔、总ALP测定管/孔的吸光度。如无法检测510nm, 亦可检测500~530nm范围内吸光度, 一般应15min内检测完毕。

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(即磷酸苯二钠)作用15min, 产生1mg酚为一个金氏单位(U/L)。

以系列Phenol标准(1~6号管)对应的金氏单位为横坐标, 以相应的 $A_{\text{标准}}$ (1~6号管)为纵坐标, 绘制标准曲线(亦可分别制作标准曲线)。以($A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$)之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、尿素抑制ALP、苯丙抑制ALP活性单位。尿素抑制ALP残余活性百分率=尿素抑制ALP残余活性/总ALP活性×100%

苯丙抑制ALP残余活性百分率=苯丙抑制ALP残余活性/总ALP活性×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

抑制 ALP 残余活性百分率

	尿素	苯丙氨酸
肝	10~20%	—
骨	1~9%	—
胎盘	—	≤0.6
非胎盘	—	≥0.7

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，推荐采用分光光度计检测。
- 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、如果空白管/孔显红色，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。常温运输，4°C保存。