碱性磷酸酶染色试剂盒（Alkaline Phosphatase Staining Assay Kit）

E1041

描述：碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)，也称碱性磷酸酯酶，是动物和微生物生理过程中一种非常重要的酶，常见于具有活跃转运功能的细胞膜内，如肾近曲小管的刷毛缘、小动脉内皮、肝脏毛细胆管膜、肾上腺、膀胱、肠上皮、附睾上皮的静纤毛等处。在碱性环境中可以水解各种天然及人工合成的磷酸单酯化合物底物。碱性磷酸酶与人类疾病如高磷酸酯酶血病、一些骨骼和肝脏疾病的发生有关，被用作很多疾病的辅助诊断依据；检测碱性磷酸酶的活性对于环境监测、食品质量控制等方面具有重要的作用。此试剂盒不是采用金属沉淀法来显示碱性磷酸酶活性，而是采用偶氮偶联法(又称同时偶联法)，结果较金属盐沉淀法灵敏可靠。该试剂盒可用于骨髓或细胞涂片、冰冻切片和梯度入水后的石蜡切片等的碱性磷酸酶染色，其染片数 50~100 张。

原理：碱性磷酸酶在一定的碱性环境中，将底物磷酸萘酯水解，产生α-萘酚，α-萘酚再与重氮剂固红偶联形成红色偶氮沉淀物，定位于细胞浆中，沉淀物显示的颜色深浅与碱性磷酸酶活性成正比。用试剂盒提供的染液 B 复染后，细胞核呈蓝色，而含碱性磷酸酶的细胞质呈红色，对比鲜明。红色偶氮沉淀物的生成反应如下图所示：

磷酸萘酯 ＋H_2O → α-萘酚 ＋ 磷酸盐

α-萘酚 ＋ 偶氮染料 →有色沉淀↓

组成：

1. 染色液 A：　　4.5 ml
2. 固红粉末：　　3 管
3. 染色液 B：　　9 ml
4. 封片剂：　　6 ml

储存：-20℃避光保存，一年有效。

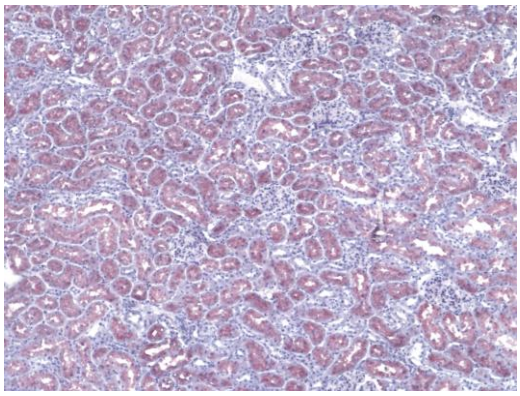
适用范围：该试剂盒可用于骨髓或细胞涂片、冰冻切片和梯度入水后的石蜡切片等的碱性磷酸酶染色。

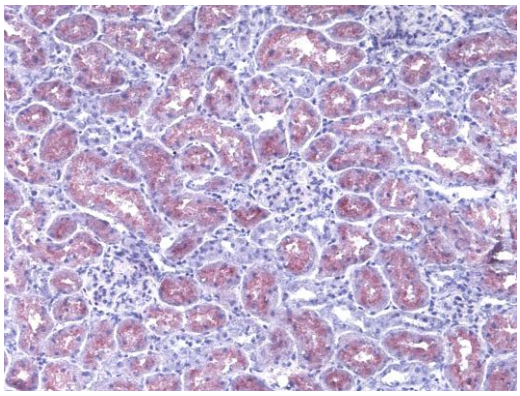
操作步骤：

1. 将固红试剂管短暂离心，以防开管后，固红粉末损失，每管加纯水 1.5ml 溶解固红。固红溶液最好在使用当天配制。
2. 取适量固红溶液与等量的染液 A 混匀，用细菌滤器过滤，除去其中的渣滓及沉淀物。（剩余的未与染液 A 混合的固红溶液，根据下次的预期用量，分装密封避光保存于-20℃，避免反复开封与冻融，一个月内有效。）
3. 将滤液滴加到玻片组织细胞处，若是组织切片，避光室温孵育 3~15min；细胞涂片或石蜡切片，避光室温孵育 30~40min，若着色过浅，可适当延长孵育时间，但不要超过 1.5h。
4. 自来水流水洗 1-2min，流水不能直接冲在组织上，水流速度不能快，以免损坏组织。
5. 滴加染液 B 复染，室温孵育 1-3min，水洗，方法同步骤 4，若着色过浅，可适当延长孵育时间。
6. 镜检，或封片后镜检。

说明：

1. 将溶解后的固红，与染液 A 混合后，往往会出现红色沉淀物，是未酯化的萘酚与固红偶联形成的，过滤后溶液清明略带红色。
2. 为防止染色过程中染液蒸干，可置入湿盒中避光孵育。
3. 在组织切片中，碱性磷酸酶可被下列物质所抑制：碘液、15%醋酸、三氯醋酸、聚雌二醇磷酸酯、铍、半胱氨酸、氰化物等。某些固定剂（如甲醛、丙酮、乙醇）和包埋过程（石蜡、聚乙二醇）都可在一定程度上抑制碱性磷酸酶活性，冰冻切片的包埋剂推荐普利莱的组织冰冻切片 OCT 包埋剂 C1400。
4. 由于偶联重氮盐生成的有色沉淀产物不溶于水，但溶于有机溶剂，所以封片时不能使用含二甲苯的封片剂，只能甘油明胶封片剂或水溶性封片剂。
5. 第一次使用本试剂盒时建议先取 1-2 个样品做预实验。





上图为本试剂盒对大鼠肾脏冰冻切片的组化染色。

红色部分为碱性磷酸酶的活性部位，蓝色部分为苏木素对细胞核的染色，对比明显。