

碱性磷酸酶活性检测试剂盒 E1040

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, 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。ALP 与人类疾病如高磷酸酯酶血症、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。本试剂盒(Alkaline Phosphatase Assay Kit)可以快速、便捷地检测细胞或组织的裂解液或匀浆液、血清、血浆、尿液等样品中内源性的碱性磷酸酶活性。产品包括标准品和空白对照, 本试剂盒可进行 100 个样品的检测。

原理: 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 para-nitrophenol。para-nitrophenol (*p*-nitrophenol) 呈黄色, 可以在 400-415nm 检测吸光度。产物颜色越深, 碱性磷酸酶活性越高, 反之则酶活性越低, 据此可以计算出碱性磷酸酶活性水平。

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。

组成:

1. 检测缓冲液 15ml
2. 显色底物 4 管
3. 标准品 (*p*-nitrophenol 溶液) 0.1ml
4. 反应终止液 12ml

储存: -20°C 保存, 12 个月有效。其中显色底物和 *p*-nitrophenol 溶液需避光保存。

适用范围: 本试剂盒可以检测细胞或组织的裂解液或匀浆液、血浆、血清、尿液或纯化的酶样品等中的碱性磷酸酶活性。

操作步骤:

1. 试剂准备: 将所有试剂取出, 恢复至室温使用。
 - a. 显色底物溶液: 取一管显色底物, 溶解于 1.3ml 的检测缓冲液中, 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。
 - b. 标准品工作液: 取 10 μ l *p*-nitrophenol 溶液 (10mM), 用检测缓冲液稀释至 0.2ml, 最终浓度为 0.5mM。
2. 样品准备:
 - a. 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和组织, 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°C 冻存, 但需避免反复冻融。
 - b. 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。样品可以 -80°C 冻存, 但需避免反复冻融。
 - c. 样品的稀释: (若有较多样本需测定, 建议先取适当的样品进行预实验。) 如果样品中含有较高活性的碱性磷酸酶, 测定的 OD 值超过标曲范围, 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。(大鼠血清: 建议稀释 10-50 倍; 小鼠肾脏: 建议按每 10mg 组织加 1ml 组织裂解液的比例进行研磨或匀浆, 离心取上清后稀释 100 倍左右再进行测定; 小鼠肝脏: 建议按每 10mg 组织加 1ml 水或组织裂解液的比例进行研磨或匀浆, 离心取上清后稀释 2-4 倍再进行测定。)
3. 参考下表使用 96 孔板设置标准品孔 (S1-S6)。

	S1	S2	S3	S4	S5	S6
--	----	----	----	----	----	----

0.5mM 标准品工作液 (μl)	4	8	16	24	32	45
检测缓冲液 (μl)	96	92	84	76	68	55

4. 参考下表使用 96 孔板设置空白对照孔和样品孔。样品通常可以直接加 $50\mu\text{l}$ 。如果样品中的碱性磷酸酶活性过高,可以减少样品用量(需使用检测缓冲液补足至每孔 $50\mu\text{l}$)或适当稀释后直接加 $50\mu\text{l}$ 至样品孔进行测定。

	空白对照孔	样品孔
检测缓冲液(μl)	50	—
显色底物液(μl)	50	50
样品 (μl)	—	50

5. 用枪头轻轻吹打混匀,也可借助摇床进行混匀。
6. 37°C 孵育 15-20 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)
7. 每孔加入 $100\mu\text{l}$ 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。
8. 在 405nm 测定吸光度,如果不能测定 405nm ,也可以在 $400-415\text{nm}$ 范围内检测吸光度。如果不能立即测定,可以在 2 小时内完成测定,所显现的黄色在 2 小时内稳定。
9. 根据酶活性定义,计算出样品中的碱性磷酸酶活性。

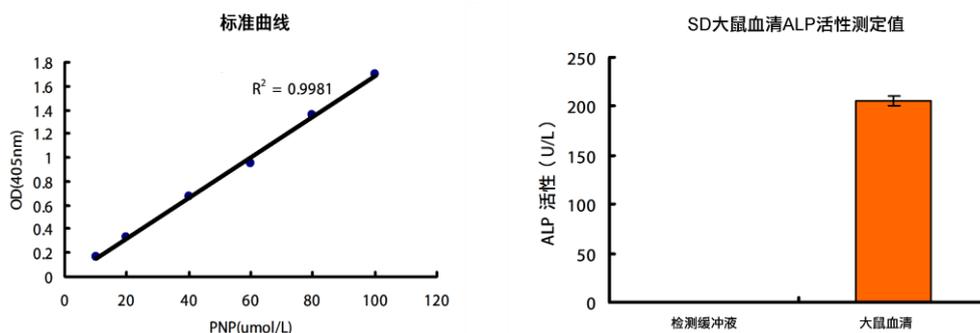
$$\text{ALP 活性 (U/L)} = \text{样品稀释倍数} \times A / T$$

A=测得的样本 OD 值经标曲换算出的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)

T=反应时间 (分钟)

说明:

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;如果样品中酶活性较高,则可以预先适当稀释样品。
2. 待测样品避免反复冻融且避免出现 EDTA、氟离子、柠檬酸盐等碱性磷酸酶的抑制剂。
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. 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作,检测缓冲液和 *p*-nitrophenol 溶液对皮肤有刺激性,请注意适当防护,反应终止液有腐蚀性,请小心操作,若不慎沾到皮肤上请马上用清水冲洗干净。
5. 该试剂盒仅供科学研究使用。



左图: 本试剂盒制作的标准曲线 右图: 本试剂盒测定的 SD 大鼠血清 ALP 活性。