

## 碱性磷酸酶同工酶检测试剂盒(抑制敏感法)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，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	规格	保存条件
碱性磷酸酶同工酶检测试剂盒	100T	4℃
试剂(A):ALP Assay Buffer	50ml	4℃避光
试剂(B):ALP 显色液	50ml	-20℃避光
试剂(C):显色基液	150ml	-20℃避光
试剂(D):Phenol 标准(1mg/ml)	2ml	RT
试剂(E):ddH <sub>2</sub> O	10ml	RT
试剂(F):尿素抑制剂	4ml	4℃
试剂(F):苯丙氨酸抑制剂	4ml	4℃
使用说明书	1份	
有效期	6个月	

### 自备材料：

- 1、离心管或 96 孔板
- 2、水浴锅或恒温箱
- 3、分光光度计或酶标仪

### 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, 如果有必要需进行适当匀浆, 低速离心取上清,  $-20^{\circ}\text{C}$ 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,  $-20^{\circ}\text{C}$ 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, 使浓度达到 0.05mg/ml, 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
Phenol(0.05mg/ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
ddH <sub>2</sub> O	0.55	0.45	0.35	0.25	0.15	0.05
相当于金氏单位(U/L)	0	10	20	30	40	50

3、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(1~5 号管)	—	0.2	—	—	—
待测样品	—	—	0.1	0.1	0.2
尿素抑制剂	—	—	0.1	—	—
苯丙氨酸抑制剂	—	—	—	0.1	—
ALP Assay Buffer	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
37°C 水浴中孵育 5min。					
ALP 显色液(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。					
显色基液	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
待测样品	0.2	—	—	—	—

以 0 号管(ddH<sub>2</sub>O)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 对照、A 标准、A 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。

4、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(1~5 号管)	—	20	—	—	—
待测样品	—	—	10	10	20
尿素抑制剂	—	—	10	—	—
苯丙氨酸抑制剂	—	—	—	10	—
ALP Assay Buffer	20	20	20	20	20
37℃水浴中孵育 5min。					
ALP 显色液(37℃提前温育)	50	50	50	50	50
立即混匀，37℃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(ddH<sub>2</sub>O)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 对照、A 标准、A 测定)，其中 A 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℃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/孔)对应的金氏单位为横坐标，以相应的 A 标准(1~5 号管/孔)为纵坐标，绘制标准曲线(亦可分别制作标准曲线)。以(A 测定-A 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×2)/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×2)/总 ALP 活性×100%

**参考区间(37℃)：**

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。