

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K009-M

产品规格: 48T(31 samples)/96T(79 samples)

检测仪器: 酶标仪(400-415 nm)

Elabscience®碱性磷酸酶(ALP)比色法测试盒
(对硝基苯磷酸二钠法)

Alkaline Phosphatase (ALP) Activity Assay Kit
(PNPP Method)

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织样本、血清(浆)等液体样本与细胞样本的碱性磷酸酶的活力。

检测原理

在碱性条件下，碱性磷酸酶催化对硝基苯磷酸二钠水解，生成对硝基苯酚和磷酸。对硝基苯酚在强碱性条件下呈亮黄色，在 405 nm 处有强烈的吸收峰。因此可以测定 405 nm 处的吸收值来计算产物的生成量，从而计算出酶活。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	30 mL × 1 瓶	60 mL × 1 瓶	-20 ℃ 保存 12 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂 × 1 支	粉剂 × 2 支	-20 ℃ 避光 保存 12 个月
试剂三 (Reagent 3)	10 mmol/L 对硝基苯酚 标准品(10 mmol/L p-Nitrophenol Standard Solution)	0.2 mL × 1 支	0.4 mL × 1 支	-20 ℃ 避光 保存 12 个月
试剂四 (Reagent 4)	终止液 (Stop Solution)	6 mL × 1 瓶	12 mL × 1 瓶	-20 ℃ 保存 12 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪（400-415 nm，最佳检测波长 405 nm）

试剂准备

① 检测前，试剂需平衡至室温。

② 500 $\mu\text{mol/L}$ 标准品的配制：

按试剂三：试剂一= 1：19的体积比混匀，现用现配，按需配制，避光待用。

③ 试剂二工作液的配制：

取一支试剂二用3 mL试剂一溶解，未用完的，可-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存一天。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	40	80	160	240	320	400	500
500 $\mu\text{mol/L}$ 标准品 (μL)	0	16	32	64	96	128	160	200
试剂一(μL)	200	184	168	136	104	72	40	0

样本准备

① 样本处理

要求：样品溶液中须避免出现EDTA、氟离子、柠檬酸盐等碱性磷酸酶的抑制剂。

血清血浆样本：直接测定。

组织样本：组织处理的匀浆介质为生理盐水(0.9% NaCl)。匀浆后，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本：取约 3×10^6 个细胞加入 0.2-0.4 mL 生理盐水(0.9% NaCl)匀浆。匀浆后，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.27-50.8 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	10-20	10%大鼠肾组织	400-1200
小鼠血清	20-30	10%小鼠肝组织	10-15
大鼠血清	10-20	10%大鼠肺组织	50-100
小鼠血浆	10-20	10%小鼠脑组织	30-50
HepG2 细胞上清	8-12	人尿液	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

- ① 试剂一取用时应倒出部分，再取用，避免试剂污染。
- ② 试剂二工作液和标准品需避光保存。

操作步骤

- ① 标准孔：取 50 μL 不同浓度标准品，加入到对应的标准孔中。
测定孔：取 50 μL 待测样本，加入到对应的测定孔中。
空白对照孔：取 50 μL 试剂一，加入到对应的空白对照孔中。
- ② 向步骤①的空白对照孔和测定孔中加入 50 μL 试剂二工作液。
向步骤①标准孔中加入 50 μL 试剂一。
- ③ 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。
- ④ 向步骤③的各孔加入 100 μL 试剂四。
- ⑤ 酶标仪上振板 5 s，于波长 405 nm 处测定各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔	空白对照孔
不同浓度的标准品(μL)	50		
待测样本(μL)		50	
试剂一(μL)	50		50
试剂二工作液(μL)		50	50
37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min			
试剂四(μL)	100	100	100
酶标仪上振板 5 s，于波长 405 nm 处测定各孔 OD 值。			

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

血清(浆)ALP 活力的计算：

定义：37℃条件下，每升血清或血浆每分钟催化底物产生 1 μmol 的对硝基苯酚所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{ALP 活力 (U/L)} = (\Delta A - b) \div a \div T \times f$$

组织或细胞中 ALP 活力的计算：

定义：37℃条件下，每克组织或细胞蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的对硝基苯酚所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{ALP 活力 (U/gprot)} = (\Delta A - b) \div a \div T \times f \div C_{pr}$$

注解：

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 吸光度对应的浓度

a: 标准曲线斜率

b: 标准曲线截距

ΔA: 测定孔 OD 值-空白对照孔 OD 值

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

T: 反应时间：10 min

C_{pr}: 样本加入检测体系时的蛋白浓度(gprot/L)

附录1 关键数据

1. 技术参数

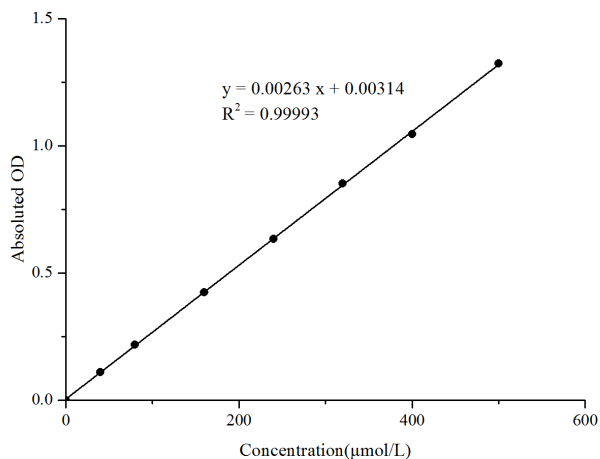
检测范围	0.27-50.8 U/L	平均批间差	4.6 %
灵敏度	0.27 U/L	平均批内差	1.2 %

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的对硝基苯酚标准品加样量50 μL ，按照操作步骤进行实验，读取各点OD值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	40	80	160	240	320	400	500
OD 值	0.050	0.158	0.265	0.476	0.684	0.902	1.107	1.374
	0.049	0.160	0.268	0.471	0.683	0.901	1.082	1.373
平均 OD 值	0.050	0.159	0.267	0.474	0.684	0.902	1.095	1.374
绝对 OD 值	0.000	0.110	0.217	0.424	0.634	0.852	1.045	1.324

②绘制标曲(如下图)：



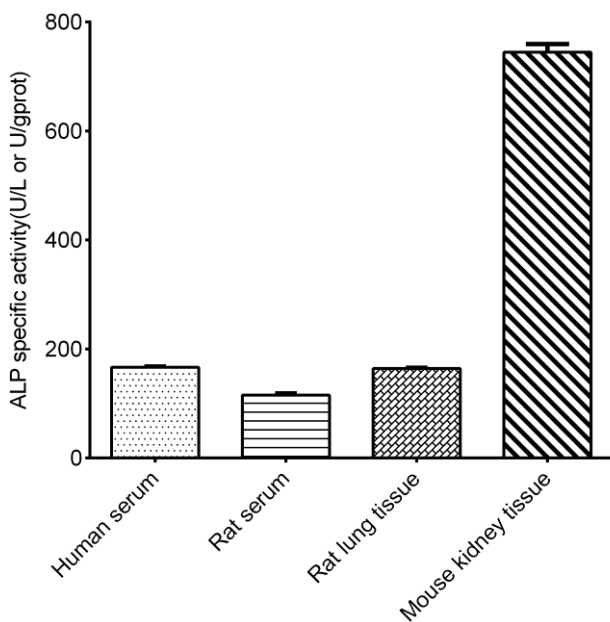
附录2 实例分析

例如检测人血清(数据仅供参考):

用试剂一将人血清稀释10倍,取50 μL 稀释后的样本,按操作表进行检测,其结果如下:标准曲线: $y = 0.0027x - 0.0051$, 空白对照孔OD值为0.099, 测定孔OD值为0.544, 计算结果为:

$$\text{ALP 活性 (U/L)} = (0.544 - 0.099 + 0.0051) \div 0.0027 \div 10 \times 10 = 166.70 \text{ U/L}$$

按照说明书,测定人血清(稀释10倍,加样量50 μL)、大鼠血清(稀释10倍,加样量50 μL)大鼠肺组织(10%匀浆蛋白浓度为3.18 gprot/L , 稀释80倍,加样量50 μL) 和小鼠肾组织(10%匀浆蛋白浓度为6.33 gprot/L , 稀释400倍,加样量50 μL)中的ALP活性(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测值不稳定, 复孔差异大	加样时间过长	尽可能的缩短加样时间
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数, 重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本, 重新检测
	试剂二工作液失效	在有效期内使用
样本测量结果 >50.8 U/L	样本浓度太高	选择合适稀释倍数, 重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用, 如将其用于临床诊断或任何其他用途, 我公司将不对因此产生的问题负责, 亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器, 严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责, 不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责, 使用前请充分考虑样本可能的使用量, 预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Zhang X, He C, Chen Y, et al. Cyclic reactions-mediated self-supply of H₂O₂ and O₂ for cooperative chemodynamic/starvation cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2021, 275:120987-. IF:12.479
2. Xia H, Scholtes C, Dufour CR, et al. Insulin action and resistance are dependent on a GSK3 β -FBXW7-ERR α transcriptional axis. *Nat Commun*. 2022; 13 (1):2105. IF:14.919
3. Liu Q, Zhang T X, Zheng Y D, et al. Calixarene-Embedded Nanoparticles for Interference-Free Gene-Drug Combination Cancer Therapy[J]. *Small*, 2021, 2006223. IF:11.459
4. He C, Zhang X, Chen C, et al. A solid lipid coated calcium peroxide nanocarrier enables combined cancer chemo/chemodynamic therapy with O₂/H₂O₂ self-sufficiency[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 122. IF:8.203
5. Chen L, Tao F, Zhang Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 accelerates liver regeneration by downregulating Tgf β 1 and attenuating Tgf β signaling in mice[J]. *FEBS Letters*, 2020, 594(17). IF:6.665
6. Omar N, Frank J, Kruger J, et al. Effects of High Intakes of Fructose and Galactose, with or Without Added Fructooligosaccharides, on Metabolic Factors, Inflammation, and Gut Integrity in a Rat Model[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2021:2001133. IF:5.914
7. Wang C, Ma C, Fu K, et al. Phillygenin Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis via Modulating Inflammation and Gut Microbiota[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 9, 21. IF:5.81
8. Du Y Q, Zheng Y Z, Yu C X M, et al. The Mechanisms of Yu Ping Feng San in Tracking the Cisplatin-Resistance by Regulating ATP-Binding Cassette Transporter and Glutathione S-Transferase in Lung Cancer Cells[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021; 12: 678126. IF:5.81
9. Zeng X Peng, Wang L J, Guo L H, et al. Dasatinib ameliorates chronic pancreatitis induced by caerulein via anti- fibrotic and anti-inflammatory mechanism[J]. *Pharmacological Research*, 2019, 147, 104357. IF:5.574
10. Cao X, Liang Y, Liu R, et al. Uncovering the Pharmacological Mechanisms of Gexia-Zhuyu Formula (GXZY) in Treating Liver Cirrhosis by an Integrative Pharmacology Strategy. *Front Pharmacol*. 2022; 13:793888. IF:5.331

11. Wang Y, Xie W, Feng Y, et al. Epithelial-derived exosomes promote M2 macrophage polarization via Notch2/SOCS1 during mechanical ventilation. *Int J Mol Med.* 2022; 50 (1). IF:5.314
12. Jung D S, Son Y J, Shin J M, et al. Gymnaster Koraiensis Extract Alleviated Metabolic Syndrome Symptoms and Stimulated UCP1 -Independent Energy Consumption via AMPK Activation in White Adipose Tissue[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020. IF:5.309
13. Ali A K, Komal A K, Almutairi S M, et al. Natural killer cell-derived IL-10 prevents liver damage during sustained murine cytomegalovirus infection[J]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: 2688. IF:5.085
14. Xu Y , Zhang Y , Xu Y , et al. Activation of CD137 signaling promotes macrophage apoptosis dependent on p38 MAPK pathway-mediated mitochondrial fission[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2021 Jul;136:106003. IF:5.085
15. Naseh A, Shirin B, Maryam M, et al. Attenuation of chronic arsenic neurotoxicity via melatonin in male offspring of maternal rats exposed to arsenic during conception: Involvement of oxidative DNA damage and inflammatory signaling cascades[J]. *Life Sciences* 266 (2021) 118876. IF:5.037
16. Ahmed A E, Alshehri A, Al-Kahtani M A, et al. Vitamin E and selenium administration synergistically mitigates ivermectin and doramectin-induced testicular dysfunction in male Wistar albino rats[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 124: 109841. IF:4.545
17. Su S, Tian H, Jia X, et al. Mechanistic insights into the effects of SREBP1c on hepatic stellate cell and liver fibrosis[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
18. Wang L J, He L, Hao L, et al. Isoliquiritigenin ameliorates caerulein-induced chronic pancreatitis by inhibiting the activation of PSCs and pancreatic infiltration of macrophages[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
19. Dejan Lazić, Andreas Scheurer, Dušan Čočić, et al. New bis-pyrazolylpyridine ruthenium(III) complex as a potential anticancer drug: In vitro and in vivo activity in murine colon cancer[J]. *Dalton Transactions*, 2021 Jun; 50(22):7686-7704. IF:4.39
20. Li X, Lv Z, Chen J, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* B10 can alleviate liver apoptosis and oxidative stress induced by aflatoxin B1[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 151:112124. IF:4.06
21. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al.

- Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2 diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. *Gene*, 2020, 768(7):145288. IF:3.688
22. Zhang S, Jiang L, Hu H, et al. Pretreatment of exosomes derived from hUCMSCs with TNF- α ameliorates acute liver failure by inhibiting the activation of NLRP3 in macrophage[J]. *Life Sciences*, 2020, 246: 117401. IF:3.647
 23. Yu H, Zhang L, Chen P, et al. Dietary bile acids enhance growth, and alleviate hepatic fibrosis induced by a high starch diet via AKT/FOXO1 and cAMP/AMPK/SREBP1 pathway in *Micropterus salmoides*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10. IF:3.367
 24. Sohini Sen, Shaunak Ghosh, Sayantan De, et al. Immunomodulatory and antimicrobial non-mulberry *Antheraea mylitta* silk fibroin accelerates in vitro fibroblast repair and regeneration by protecting oxidative stress[J]. *RSC Advances*, 2021 May; 11(31):19265-19282. IF:3.361
 25. Li Jianda, Yuan Chen, Liu Peng et al. Red blood cells serve as a vehicle for PEDV transmission.[J]. *Vet Microbiol*, 2021, 257: 109081. IF:3.293
 26. Chen L, Tao F, Zhang Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 accelerates liver regeneration by downregulating Tgfb1 and attenuating Tgf β signaling in mice[J]. *FEBS Letters*, 2020. IF:3.057
 27. Cui Y, Wang Y, Liu G. Protective Effect of Barbaloin in a Rat Model of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Through the Regulation of the CNPY2?PERK Pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019. IF:2.928
 28. Sun Yan-Chun, Han Shi-Cheng, Yao Ming-Zhu, et al. High-throughput metabolomics method based on liquid chromatography-mass spectrometry: Insights into the underlying mechanisms of salinity-alkalinity exposure-induced metabolites changes in *Barbus capito*[J]. *Journal of Separation Science*, 2021 Jan; 44(2):497-512. IF:2.878
 29. Mustafa H N, Hegazy G A, El Awdan S A, et al. Liver ischemia/reperfusion injury, a setting in which the functional mass is reduced and the role of PDE5 inhibitor[J]. *Eur. J. Anat*, 2019, 23(5): 325-332. IF:2.638
 30. Chen L, Ma K, Fan H, et al. Exogenous hydrogen sulfide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress and cell apoptosis.[J]. *Spandidos Publications*, 2021(2). IF:2.447