（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°C 保存 12 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂 × 1 支	粉剂 × 2 支	-20°C 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°C 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°C 保存 12 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	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 μmol/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°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(μmol/L)	**0**	**40**	**80**	**160**	**240**	**320**	**400**	**500**
500 μmol/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°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°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°C 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。

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

组织或细胞中 ALP 活力的计算：

定义：37°C 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。

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

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

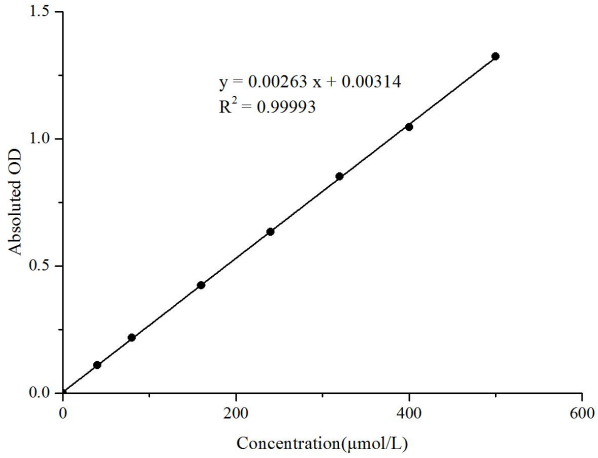
检测范围	0.27-50.8 U/L	平均批间差	4.6 %
灵敏度	0.27 U/L	平均批内差	1.2 %

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 (μmol/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)：



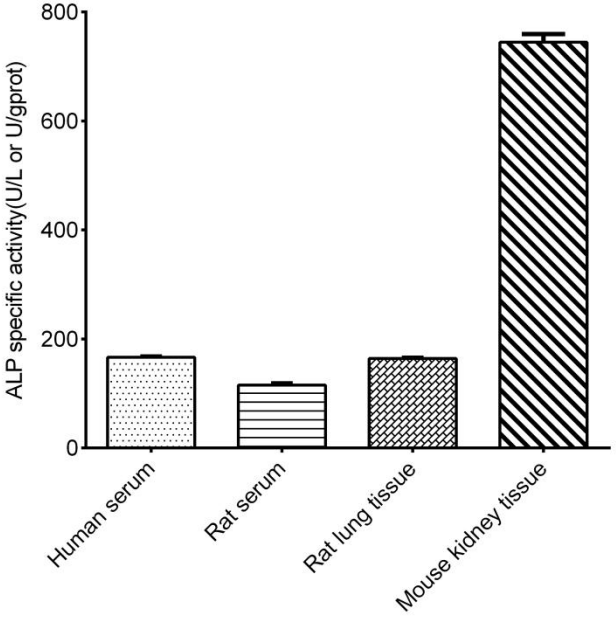
附录2 实例分析

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 = 0.0027 x - 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同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. Liu Y, Wang Z, Wang Y, et al. Ca-DEX biomineralization-inducing nuts reverse oxidative stress and bone loss in rheumatoid arthritis[J]. Nanoscale, 2023, 15(33): 13822-13833.

2. Ma X, Zhang W, Chen Y, et al. Paeoniflorin inhibited GSDMD to alleviate ANIT-induced cholestasis via pyroptosis signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2024, 134: 156021.

3. Sheng Y, Zhou J, Zhang P, et al. Effect of chiral polymers on Muse cell proliferation and differentiation[J]. Materials Today Chemistry, 2024, 42: 102425.

4. Zhou Z , Jin Z , Tian Y ,et al.CDK14 is regulated by IGF2BP2 and involved in osteogenic differentiation via Wnt/ β -catenin signaling pathway in vitro[J].Life sciences, 2024, 358:123148.DOI:10.1016/j.lfs.2024.123148.

5. Zhang Y , Niu Y , Fu C ,et al.Preparation, identification and screening of anti-osteoporosis milk-derived peptides: Intervention effects in osteoporosis rats[J].Food Bioscience, 2024, 62.DOI:10.1016/j.fbio.2024.105120.