

(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-K091-M

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)/500Assays (484 samples)

检测仪器: 酶标仪 (500-530 nm)

## **Elabscience®碱性磷酸酶(ALP)比色法测试盒** **Alkaline Phosphatase (ALP) Activity Assay Kit**

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](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://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。

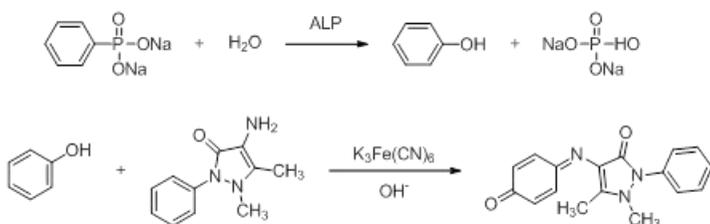
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测动物血清(浆)、体液、组织及细胞中碱性磷酸酶的活力。

## 检测原理

在 pH=10 的反应液中，碱性磷酸酶催化磷酸苯二钠水解，生成游离酚和磷酸。酚在碱性溶液中与 4-氨基安替吡啉结合，并经铁氰化钾氧化生成红色的醌的衍生物，根据红色的深浅计算酶活的高低。



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）。

## 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)	规格 3 (Size 3) (500 Assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	1.5 mL×1 支	3 mL×1 瓶	15 mL × 1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	基质液 (Substrate Solution)	1.5 mL×1 支	3 mL×1 瓶	15 mL × 1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	9 mL×1 瓶	18 mL×1 瓶	50 mL × 2 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	0.5 mg/mL 酚标 准储备液 (0.5 mg/mL Phenol Standard)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×1 支	5 mL × 1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 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（500-530 nm，最佳检测波长 520 nm）、涡旋混匀仪、37℃恒温箱。

**耗材：**枪头（1000  $\mu$ L，200  $\mu$ L，10  $\mu$ L）、EP 管（10 mL，2 mL）。

**试剂：**双蒸水、PBS（0.01 M，pH 7.4）或生理盐水（0.9% NaCl）

## 试剂准备

① 试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 工作液的配制：

按试剂一：试剂二为 1:1 的体积比混匀，现用现配，未用完的试剂 2-8℃ 避光可保存 1 天。

③ 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(mg/mL)	0	0.025	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
0.5 mg/mL 标准品( $\mu$ L)	0	5	10	20	40	60	80	100
双蒸水( $\mu$ L)	100	95	90	80	60	40	20	0

## 样本准备

### ① 样本处理

血清血浆等液体样本：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)或 PBS (0.01 M, pH 7.4)。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 10<sup>6</sup> 个细胞加入 300-500 μL 生理盐水(0.9% NaCl)或 PBS (0.01 M, pH 7.4) 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，不同样本的稀释如下表（仅供参考）：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	不稀释	10%小鼠肾匀浆	30-50 倍
人尿液	不稀释	10%小鼠肝匀浆	不稀释
大鼠血清	不稀释	HepG2 细胞	不稀释
细胞上清	不稀释	10%小鼠脑匀浆	不稀释

注：稀释液为生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）。

## 实验关键点

操作时，加完工作液置 37℃ 孵育 15 min，迅速加入试剂三，避免长时间放置后加样导致结果不准确。

## 操作步骤

- ① 标准孔：取 5  $\mu\text{L}$  不同浓度的标准品加入到酶标板孔中；  
测定孔：取 5  $\mu\text{L}$  待测样本加入到酶标板孔中；
- ② 向①步骤中标准孔、测定孔加入 50  $\mu\text{L}$  工作液。
- ③ 酶标仪振板 30 s，37°C 孵育 15 min。
- ④ 向③步骤中标准孔、测定孔加入 150  $\mu\text{L}$  试剂三。。
- ⑤ 混匀，酶标仪 520 nm 测 OD 值。

## 操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品 ( $\mu\text{L}$ )	5	--
待测样本 ( $\mu\text{L}$ )	--	5
工作液 ( $\mu\text{L}$ )	50	50
酶标仪振板 30 s，37°C 孵育 15 min		
试剂三 ( $\mu\text{L}$ )	150	150
混匀，酶标仪 520 nm 处，测各孔 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）等液体样本中 ALP 活力计算：

定义：100 mL 血清在 37°C 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金式单位。

$$\begin{aligned} \text{ALP 活力} \\ (\text{金式单位}/100 \text{ mL}) \end{aligned} = (\Delta A - b) \div a \times V_1 \times f$$

组织、细胞中 ALP 活力计算：

定义：每克组织或细胞蛋白在 37°C 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金式单位。

$$\begin{aligned} \text{ALP 活力} \\ (\text{金式单位}/\text{gprot}) \end{aligned} = (\Delta A - b) \div a \div C_{pr} \times f$$

**注解：**

$\Delta A$ ：测定孔 OD 值-空白 OD 值（标准品浓度为 0 时的 OD 值）

$V_1$ ：单位定义中血清体积（100 mL）

$f$ ：样本加入检测体系前的稀释倍数

$C_{pr}$ ：待测样本的蛋白浓度（gprot/mL）

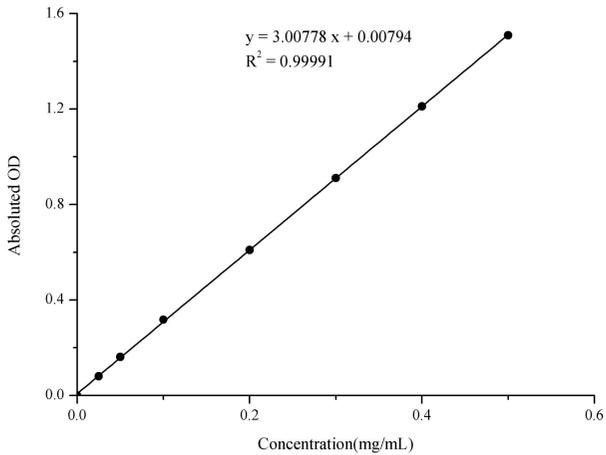
## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

检测范围	0.13-50 金式单位/100 mL	平均批间差	8.5 %
灵敏度	0.13 金式单位/100 mL	平均批内差	5.1 %
平均回收率	94 %		

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 标准曲线(如下图):



## 附录2 实例分析

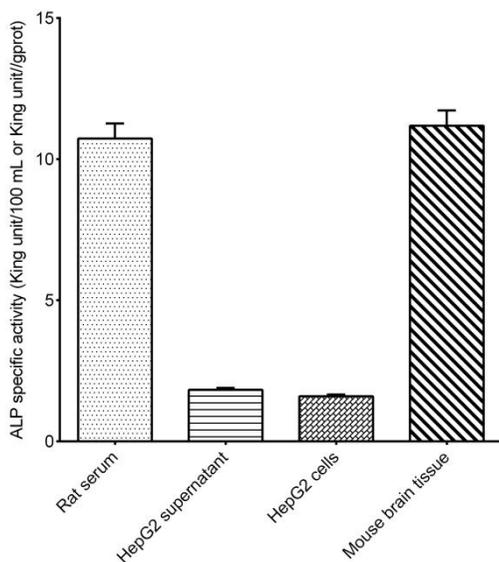
例如检测大鼠血清(数据仅供参考):

取5  $\mu\text{L}$ 大鼠血清,按说明书中操作表操作,结果如下:

空白管OD值为0.091,测定管OD值为0.422,标准曲线为 $y = 3.059x + 0.0027$ ,带入公式计算得:

$$\text{ALP 活力} = (0.422 - 0.091 - 0.0027) \div 3.059 \times 100 = 10.73 \text{ 金氏单位/100 mL} \\ (\text{金氏单位/100 mL})$$

按照说明书操作,测定大鼠血清(加样量5  $\mu\text{L}$ )、HepG2细胞上清(加样量5  $\mu\text{L}$ )、小鼠脑组织(10%组织匀浆的蛋白含量0.004  $\text{gprot/mL}$ ,加样量5  $\mu\text{L}$ )及HepG2细胞(蛋白含量0.010  $\text{gprot/mL}$ ,加样量5  $\mu\text{L}$ )中碱性磷酸酶的活力(如下图):



### 附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	37°C 孵育后没有迅速加入试剂三	37°C 孵育后应迅速加入试剂三
	加试剂三后没有充分混匀	加完试剂三，充分混匀
样本和标准品显色很低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
样本测不出值 样本测量结果 >50 金式单位/100 mL	样本稀释倍数太大	升高样本检测液制备过程中的组织浓度，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
	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. Zhu N, Chen S, et al. Enhancing Glioblastoma Immunotherapy with Integrated Chimeric Antigen Receptor T Cells through the Re-Education of Tumor-Associated Microglia and Macrophages[J]. ACS nano, 2024, 18(17): 11165-11182.
2. Mo W, Liu S, Zhao X, et al. ROS scavenging nanozyme modulates immunosuppression for sensitized cancer immunotherapy[J]. Advanced Healthcare Materials, 2023, 12(21): 2300191.
3. Yuan J, Ding L, Han L, et al. Thermal/ultrasound-triggered release of liposomes loaded with Ganoderma applanatum polysaccharide from microbubbles for enhanced tumour ablation[J]. Journal of Controlled Release, 2023, 363: 84-100.
4. Wang Y, Kong B, Chen X, et al. BMSC exosome-enriched acellular fish scale scaffolds promote bone regeneration[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2022, 20(1): 444.
5. Zeng Z, Quan C, Zhou S, et al. Gut microbiota and metabolic modulation by supplementation of polysaccharide-producing Bacillus licheniformis from Tibetan Yaks: A comprehensive multi-omics analysis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 254: 127808.



