

## 碱性磷酸酶检测试剂盒 (100T)

### 一般说明

碱性磷酸酶 (ALP或AKP) 是广泛分布于人体肝脏、骨骼、肠、肾和胎盘等组织经肝脏向胆外排出的一种酶。这种酶能催化核酸分子脱掉5' 磷酸基团, 从而使DNA或RNA片段的5' -P末端转换成5' -OH末端。但它不是单一的酶, 而是一组同工酶, 碱性磷酸酶在碱性环境中催化磷酸酯水解, 形成有机自由基和无机磷酸盐。该测试利用4-甲基伞形酮磷酸酯被ALP水解成高荧光产物4-甲基伞形酮。荧光增加的速率与酶活性成正比。检测限度为0.02 U/L。

### 适用性

直接测定: 血清、血浆和其他来源中的ALP 活性。

药物发现: ALP调节剂的高通量筛选。

### 试剂盒组成

反应试剂: 14 mL      100x 标准液: 120 $\mu$ L

储存: -20 $^{\circ}$ C。

### 样品制备

ALP 在 4 $^{\circ}$ C 下可稳定 48 小时, 在 -20 $^{\circ}$ C 下可稳定 2 个月。EDTA、草酸盐、氟化物、柠檬酸盐是已知的 ALP 抑制剂, 应避免在样品制备中使用。血清、血浆 (无 EDTA/柠檬酸盐, 最好是未溶血的) 和细胞培养基可以直接检测。使用前将所有试剂解冻至室温。该测定基于动力学反应。建议使用多通道移液器。向样品中添加试剂应迅速, 混合应短暂而彻底。可在室温或 37 $^{\circ}$ C 下进行检测。

### 检测步骤

1. 标准: 首先将 5 $\mu$ L 的 100x 标准液与 495 $\mu$ L 蒸馏水混合以获得 1x 标准液。将 0、3、6 和 10 $\mu$ L 1x 标准品转移到黑色 96 孔板的单独孔中, 并分别向每个标准孔中加入 10、7、4 和 0 $\mu$ L 蒸馏水, 使每个体积达到 10 $\mu$ L。

样品: 将 10 $\mu$ L 样品转移到孔板的单独孔中。

2. 使用多道移液器, 将 90  $\mu$ L 反应试剂添加到所有标准和样品孔中。快速轻敲孔板以混合, 并在所需温度 (例如 25 $^{\circ}$ C) 下孵育所需的时间 (例如 20 分钟)。

3. 读取荧光强度 ( $\lambda_{exc}$  = 360nm,  $\lambda_{em}$  = 450nm)。

4. 计算: 根据每个标准在 20 分钟时测量的荧光值, 绘制曲线确定斜率。样品的 ALP 活性为:

$$\text{ALP Activity} = \frac{F_{\text{样本}} - F_{\text{空白}}}{\text{Slope} \times t} \times n \quad (\text{U/L})$$

$F_{\text{样本}}$  和  $F_{\text{空白}}$  是样品和空白 (即没有标准液孔) 的荧光值。t 是反应时间 (例如 20 分钟)。n 是稀释倍数。如果计算值高于 10 U/L, 则使用较短的孵育时间, 或用水稀释样品并重复测定。将结果乘以稀释倍数n。

单位定义: 1 个单位 (U) 的 ALP 在 pH 10.5 和室温 (25 $^{\circ}$ C) 下催化 1 $\mu$ mole 的 4-甲基伞形酮磷酸酯转化为 4-甲基伞形酮。





**注意事项:**

1. 对于ALP活性较低的样品 ( $< 1 \text{ U/L}$ ), 建议将孵育时间延长至例如60分钟。
2. 对于384孔分析, 反应体积可以缩小, 对于比色皿分析, 反应体积可以放大。
3. 本产品仅供研究用, 使用过程中应严格遵循实验安全措施。

