

## 碱性磷酸酶检测试剂盒(荧光法)

产品编号	产品名称	包装
P0322S	碱性磷酸酶检测试剂盒(荧光法)	100次
P0322M	碱性磷酸酶检测试剂盒(荧光法)	500次

### 产品简介:

- 碧云天研发的碱性磷酸酶检测试剂盒(荧光法), 即Alkaline Phosphatase Assay Kit (Fluorometric), 简称ALP检测试剂盒或AP检测试剂盒, 是一种使用荧光法快速、高灵敏度地检测血清或血浆等生物体液、细胞培养上清以及细胞或组织裂解液等样品中碱性磷酸酶活性的试剂盒。通常0.1-1 $\mu$ l血清或血浆样品足够用于本试剂盒的检测。
- 碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, AP/ALP/AKP/ALKP/ALPase/Alk Phos), 也称碱性磷酸酯酶(EC 3.1.3.1), 可以在碱性条件下催化磷酸酯键的水解。大部分碱性磷酸酶以同源二聚体形式存在, 每个催化位点含有酶活性所需的三个金属离子, 即两个锌和一个镁[1]。碱性磷酸酶参与机体代谢、信号转导、分子运输和遗传信息的表达等生物学过程, 其生理功能对生物体至关重要[2]。哺乳动物中, 肝脏、胆管、肾脏、骨头和胎盘中的碱性磷酸酶活性比较高。常见的碱性磷酸酶包括肠道碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, intestinal, ALPI)、非组织特异性碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme, ALPL)和胎盘碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, placental type, 也称Placental alkaline phosphatase, PLAP)。常见的小牛肠碱性磷酸酶(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, CIAP/CIP)被广泛用于二抗等的标记最终用于蛋白和核酸等的检测, 也常用于DNA或RNA 5'和3'末端去磷酸化(去单磷酸化), 特别是质粒的5'末端去磷酸化以避免质粒自连等。
- 在实验室医学中, ALP是一系列疾病的公认生物标志物。干细胞, 如iPS中, 碱性磷酸酶的活性很高, 常被用作iPS成功诱导的标志。另外, 分化的结肠癌细胞中碱性磷酸酶的活性也会显著升高, 可作为结肠癌细胞分化程度定性和定量的指标。此外, 血清中碱性磷酸酯酶的升高, 被称作高碱性磷酸酶血症(Hyper alkaline phosphatasemia), 被认为和恶性胆管阻塞(Malignant biliary obstruction)、原发性胆管硬化(Primary biliary cirrhosis)、原发性硬化胆管炎(Primary sclerosing cholangitis)、肝淋巴瘤(Hepatic lymphoma)和肝肉瘤(Hepatic sarcoidosis)等肝胆疾病密切相关。血清中碱性磷酸酶活性升高还和骨头生成密切相关, 因为碱性磷酸酶是成骨细胞的副产物。血清中碱性磷酸酶活性过低也和一些疾病相关, 儿童和孕妇血清中的碱性磷酸酶活性较普通人高一些。血清中碱性磷酸酶活性范围在20-140U/L。
- 本试剂盒检测碱性磷酸酶的原理如图1所示。在碱性条件下, 4-甲基伞形酮磷酸酯二钠盐(4-Methylumbelliferyl phosphate disodium salt, 4-MUP)在碱性磷酸酶的作用下, 被水解为4-甲基伞形酮(4-Methylumbelliferone, 4-MU)和磷酸盐(Phosphate)。生成的4-MU呈蓝色荧光, 激发波长为360nm, 发射波长为450nm。碱性磷酸酶的荧光强度与其催化产生的4-MU的量成正比, 通过检测4-MU的荧光强度最终计算出碱性磷酸酶的活性。

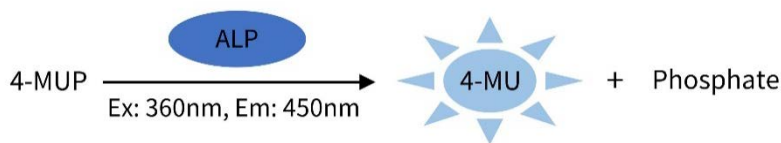


图1. 碧云天碱性磷酸酶检测试剂盒(荧光法) (P0322)检测原理图。

- **本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。**相较于碱性磷酸酶检测试剂盒(P0321), 本试剂盒的检测灵敏度更高、检测方法更加灵活。本试剂盒在样品体积为20 $\mu$ l时可检测活力低至0.008U/L的碱性磷酸酶, 在0.008-32U/L活力范围内有良好的线性关系。本试剂盒提供了碱性磷酸酶反应产物4-MU的标准溶液, 可以通过绘制标准曲线(图2A), 计算出样品中碱性磷酸酶的活性。

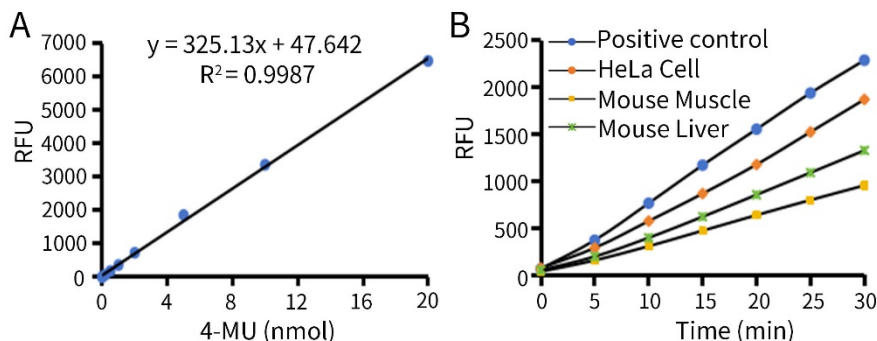


图2. 碧云天碱性磷酸酶检测试剂盒(荧光法) (P0322)对4-MU标准品、阳性对照、HeLa细胞和小鼠不同组织样品检测效果图。图2A为本试剂盒对4-MU标准品的检测效果图, 在0.005-20nmol范围内有良好的线性关系; 图2B为本试剂盒检测阳性对照(Positive

control)、2μg蛋白量的HeLa细胞裂解液样品(HeLa Cell)、60μg蛋白量的小鼠肝脏裂解样品(Mouse liver)、25μg蛋白量的小鼠腿肌裂解样品(Mouse muscle)时反应30分钟内的荧光信号变化图。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异,图中数据仅供参考。

- **本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。**使用本试剂盒中的BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay裂解获得的细胞或组织样品,也可以用于碧云天生产的其它代谢类试剂盒中同样使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay进行裂解的样品检测,通用性强;而且还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。
- **本试剂盒检测使用灵活,检测速度快,适用范围广。**本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆、尿液等生物体液、细胞培养上清以及组织或细胞裂解液等样品的检测。整个检测过程约1小时即可完成。本试剂盒不仅适合少量样本的检测,也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。
- 按照使用操作说明,用于96孔板进行检测时,本试剂盒小包装可以进行100次检测,中包装可以进行500次检测。

#### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P0322S-1	BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay	20ml
P0322S-2	ALP Assay Buffer	15ml
P0322S-3	MUP Substrate (100X)	100μl
P0322S-4	Positive Control (100X)	20μl
P0322S-5	4-MU (50mM)	50μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0322M-1	BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay	100ml
P0322M-2	ALP Assay Buffer	75ml
P0322M-3	MUP Substrate (100X)	500μl
P0322M-4	Positive Control (100X)	100μl
P0322M-5	4-MU (50mM)	250μl
—	说明书	1份

#### 保存条件:

-20°C保存,一年有效。其中4-MU须避光保存。所有试剂避免反复冻融。

#### 注意事项:

- BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、ALP Assay Buffer、MUP Substrate (100X)、4-MU (50mM)需要完全解冻并平衡至室温后再使用,否则会影响检测结果。其它试剂使用时应在冰上进行。
- 血清等样品如在4°C保存,保存时间不得超过2周,否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品宜在-20°C保存,-80°C保存更佳。
- 样品溶液中须避免含有EDTA、氟离子、酒石酸盐、草酸盐、柠檬酸盐等碱性磷酸酶的抑制剂。
- 检测时建议使用96孔黑板,推荐选购碧云天的BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖,独立包装)(FCP966)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品,不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明:

##### 1. 样品的制备:

- a. **血液样品的准备:**对于血清样品,将全血在常温如25°C下放置30分钟至2小时,不要剧烈摇晃以免溶血,待全血自然凝固并析出血清后,4°C约1000-2000×g离心10分钟,取黄色上清即得血清,注意不要吸取白色或淡黄色沉淀;对于血浆样品,将全血用肝素进行抗凝,4°C约1000-2000×g离心10分钟,取黄色或淡黄色上清即得血浆,注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上,如果不能立即检测,也可以分装并短期保存于-20°C或-80°C。对于冻存的样品,在检测前解冻后冰浴存放备用,使用前必须混匀。
- b. **细胞或组织样品的准备:**对于培养的贴壁细胞,PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞,先适当离心(如100-500×g,5分钟)收集细胞到离心管内,弃上清并吸净残留液体。按照每100万细胞加入100μl-200μl的比例加入BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay,适当吹打,冰浴5-10分钟以充分裂解细胞。4°C约12,000×g离心3-5分钟,取上清用于后续检测。对于组织样品,按照每10mg组织加入100μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例,使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48)(E6618)、Tissue Master™手持式组织研磨仪(E6600)或玻璃匀浆器在约4°C或冰浴等低温条件下匀浆。将匀浆液在4°C约12,000×g离心3-5分钟,取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4°C或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测,可以-20°C或-80°C冻存。
- c. **细胞培养上清样品的准备:**对于贴壁细胞,直接取培养液;对于悬浮细胞,离心取培养液。

##### 2. 试剂盒的准备工作:

- a. 融解BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、ALP Assay Buffer、MUP Substrate (100X)、4-MU (50mM)，平衡至室温后混匀备用。其它试剂存放于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。
- b. **MUP Substrate工作液的配制：**按照每个反应80μl的体积配制适量的MUP Substrate工作液。例如10μl MUP Substrate (100X)加入990μl ALP Assay Buffer，混匀，即可配制成1ml MUP Substrate工作液。根据待检测样品的数量，配制适量的MUP Substrate工作液。配制好的MUP Substrate工作液如果置于4°C或冰浴保存，可以在当天使用，但建议尽量现配现用。

### 3. 样品测定：

- a. 4-MU标准曲线的设置。

取2μl 4-MU (50mM)，加入98μl ALP Assay Buffer，混匀，配制成100μl浓度为1mM的4-MU标准溶液。分别取1mM的4-MU标准溶液0、0.2、0.5、1、2、5、10、20μl加入96孔板的标准品孔中，并用ALP Assay Buffer补足至20μl，此时，标准曲线的各孔4-MU的浓度和物质的量分别为0、10、25、50、100、250、500、1000μM或0、0.2、0.5、1、2、5、10、20nmol。  
注：初次检测，可以按照以上浓度设置标准曲线。在后续的实验，可以根据样品中碱性磷酸酶的活性对标准品的浓度范围进行适当调整。

- b. 阳性对照的设置。

取适量的Positive Control (100X)，用ALP Assay Buffer将其100倍稀释，然后取20μl加入96孔板作为阳性样品。例如取阳性对照(100X) 1μl，加入ALP Assay Buffer 99μl，混匀后取20μl加入96孔板作为阳性样品。

注：由于Positive Control (100X)的用量较少且易沉降，必须注意在使用前先轻轻离心一下，然后适当混匀后再使用。

- c. 取1-20μl稀释后的样品至96孔板样品孔中，并再加入ALP Assay Buffer补足到20μl。同时设置仅含ALP Assay Buffer的孔为空白对照孔。此处的样品体积记为Sv。

注：为确保数值在标准曲线范围内，建议样品同时设定多个稀释倍数，可以进行预实验确定样品的大致浓度，如果数值不在标准曲线范围内，可调整样品的稀释倍数或者增加样品的量。此处的样品稀释倍数记为n。

- d. 除4-MU标准曲线外的其余各孔中加入MUP Substrate工作液80μl，4-MU标准曲线各孔加入ALP Assay Buffer 80μl，混匀。

- e. 立即使用适当的酶标仪，激发波长设为360nm、发射波长设为450nm进行荧光检测。此时记录0分钟读值为F1。

- f. 37°C反应10-30分钟，反应时间记录为T，测定荧光值，记为F2。荧光的增强取决于碱性磷酸酶水解底物后生成的4-MU的量， $\Delta F = F2 - F1$ 。

注：为取得最佳的检测结果，反应时间可以根据待测样品中的碱性磷酸酶活性进行调整，但必须确保读数在标准曲线的范围之内。对于碱性磷酸酶活性较高的样品，建议测定总时间为20或30分钟，对应的测定间隔时间设为2分钟或5分钟。对于碱性磷酸酶活性较低的样品，可以延长测定总时长为1小时，对应的测定间隔时间设为10或20分钟；也可以连续测定30分钟，每隔1或2分钟测定一次，最后取呈线性的时间点前的数据用于分析或计算。

- g. 建立4-MU标准曲线，将 $\Delta F$ 代入标准曲线，即可计算出反应时间内样品中碱性磷酸酶催化产生的4-MU的量(记为Sa)。4-MU标准曲线可以参考图2A，在0.005-20nmol范围内有良好的线性关系。ALP活性计算公式如下：

$$\text{ALP Activity (U/L)} = \text{Sa} \times n / (\text{T} \times \text{Sv})$$

注：Sa为步骤3g根据标准曲线确定的4-MU的生成量(nmol)；

n为步骤3c样品稀释倍数；

T为步骤3f的反应时间(min)；

Sv为步骤3c中的样品体积(ml)。

碱性磷酸酶的活力定义：一个酶活力单位(Unit, U)在25或37°C，pH10.4的条件下，1分钟内可以生成1μmol的4-MU。

### 参考文献：

1. Millán JL. Purinergic Signal. 2006. 2(2):335-41.
2. Tang Z, Chen H, He H, Ma C. TrAC. 2019. 113:32-43.

### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C3206	BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒	共100ml
C3250S	多能干细胞碱性磷酸酶显色试剂盒	共100ml
P0321S	碱性磷酸酶检测试剂盒	100次
P0321M	碱性磷酸酶检测试剂盒	500次
P0322S	碱性磷酸酶检测试剂盒(荧光法)	100次
P0322M	碱性磷酸酶检测试剂盒(荧光法)	500次
P0326	酸性磷酸酶检测试剂盒	120次
P0327S	酸性磷酸酶检测试剂盒(荧光法)	100次
P0329	胎盘碱性磷酸酶检测试剂盒	100次
P0332	抗酒石酸酸性磷酸酶检测试剂盒	120次
P0335	抗氟离子酸性磷酸酶检测试剂盒	120次