

大鼠骨碱性磷酸酶（BALP）酶联免疫分析

试剂盒使用说明书

本试剂盒仅供研究使用

检测范围：15.6 U/L - 1000 U/L

最低检测限：3.9 U/L

特异性：本试剂盒可同时检测天然或重组的大鼠 BALP，且与其他相关蛋白无交叉反应。

有效期：6 个月

预期应用：ELISA 法定量测定大鼠血清、血浆、细胞培养上清或其它相关生物液体中 BALP 含量。

说明

1. 试剂盒保存：-20℃（较长时间不用时）；2-8℃（频繁使用时）。
2. 浓洗涤液低温保存会有盐析出，稀释时可在水浴中加温助溶。
3. 中、英文说明书可能会有不一致之处，请以英文说明书为准。
4. 刚开启的酶联板孔中可能会含有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。

概述

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。但它不是单一的酶，而是一组同功酶。目前已发现有 AKP1、AKP2、AKP3、AKP4、AKP 与 AKP6 六种同功酶。其中第 1、2、6 种均来自肝脏，第 3 种来自骨细胞，第 4 种产生于胎盘及癌细胞，而第 5 种则来自小肠绒毛上皮与成纤维细胞。血清中的骨碱性磷酸酶的浓度被认为反映了成骨细胞的代谢活性，而骨代谢的精确评价对于明确骨代谢病的严重程度和治疗反应有着重要意义。因此在变形性胃炎、骨软化、原发性甲状旁腺功能亢进、肾性骨营养不良、骨质疏松和骨转移瘤中，血清骨碱性磷酸酶水平的检测有着用武之地。骨碱性磷酸酶的测定就被应用于变形性胃炎诊断和病情的检测。

实验原理

用纯化的抗体包被微孔板，制成固相载体，往包被抗 BALP 抗体的微孔中依次加入标本或标准品、生物素化的抗 BALP 抗体、HRP 标记的亲合素，经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 BALP 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值），计算样品浓度。

试剂盒组成及试剂配制

1. 酶联板（Assay plate）：一块（96 孔）。
2. 标准品（Standard）：2 瓶（冻干品）。
3. 样品稀释液（Sample Diluent）：1×20ml/瓶。
4. 生物素标记抗体稀释液（Biotin-antibody Diluent）：1×10ml/瓶。
5. 辣根过氧化物酶标记亲合素稀释液（HRP-avidin Diluent）：1×10ml/瓶。
6. 生物素标记抗体（Biotin-antibody）：1×120ul/瓶（1：100）
7. 辣根过氧化物酶标记亲合素（HRP-avidin）：1×120ul/瓶（1：100）
8. 底物溶液（TMB Substrate）：1×10ml/瓶。
9. 浓洗涤液（Wash Buffer）：1×20ml/瓶，使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。
10. 终止液（Stop Solution）：1×10ml/瓶（2N H₂SO₄）。

需要而未提供的试剂和器材

1. 标准规格酶标仪
2. 高速离心机
3. 电热恒温培养箱
4. 干净的试管和 Eppendorf 管
5. 系列可调节移液器及吸头，一次检测样品较多时，最好用多通道移液器
6. 蒸馏水，容量瓶等

标本的采集及保存

1. 血清：全血标本请于室温放置 2 小时或 4℃ 过夜后于 1000 x g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将标本放于 -20℃ 或 -80℃ 保存，但应避免反复冻融。
2. 血浆：可用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，标本采集后 30 分钟内于 2 - 8° C 1000 x g 离心 15 分钟，或将标本放于 -20℃ 或 -80℃ 保存，但应避免反复冻融。
3. 细胞培养物上清或其它生物标本：请 1000 x g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将标本放于 -20℃ 或 -80℃ 保存，但应避免反复冻融。

注：标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

标本的稀释原则：

首先通过文献检索的方式了解待测样本的大致含量，确定适当的稀释倍数。只有稀释至标准曲线的范围内，检测的结果才是准确的。稀释的过程中，应做好详细的记录。最后计算浓度时，稀释了“N”倍，标本的浓度应再乘以“N”。

标准品的稀释原则：2 瓶，每瓶临用前以样品稀释液稀释至 1ml，盖好后静置 10 分钟以上，然后反复颠倒/搓动以助溶解，其浓度为 1000 U/L，做系列倍比稀释后，分别稀释 1000 U/L，500 U/L，250 U/L，125 U/L，62.5 U/L，31.2 U/L，15.6 U/L，样品稀释液直接作为标准浓度 0 U/L，临用前 15 分钟内配制。

如配制 500 U/L 标准品：取 0.5ml（不要少于 0.5ml）1000 U/L 的上述标准品加入含 0.5ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀即可，其余浓度以此类推。

生物素标记抗体的稀释原则：

临用前以生物素标记抗体稀释液稀释，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制（每孔 100ul），实际配制时应多配制 0.1-0.2ml。如 10ul 生物素标记抗体加 990ul 生物素标记抗体稀释液的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制。

辣根过氧化物酶标记亲和素的稀释原则：

临用前以辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液稀释，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制（每孔 100ul），实际配制时应多配制 0.1-0.2ml。如 10ul 辣根过氧化物酶标记亲和

素加 990ul 辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液 的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制。

操作步骤

实验开始前，请提前配置好所有试剂，试剂或样品稀释时，均需混匀，混匀时尽量避免起泡。每次检测都应该做标准曲线。如样品浓度过高时，用样品稀释液进行稀释，以使样品符合试剂盒的检测范围。

1. 加样：分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100ul，余孔分别加标准品或待测样品 100ul，注意不要有气泡，加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，酶标板加上盖或覆膜，37℃反应 120 分钟。

为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。

2. 弃去液体，甩干，不用洗涤。每孔加生物素标记抗体工作液 100ul（取 1ul 生物素标记抗体加 99ul 生物素标记抗体稀释液的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制），37℃,60 分钟。

3. 温育 60 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，350ul/每孔，甩干。

4. 每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液（同生物素标记抗体工作液） 100ul，37℃，60 分钟。

5. 温育 60 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，每次浸泡 1-2 分钟，350ul/每孔，甩干。

6. 依序每孔加底物溶液 90ul，37℃避光显色（30 分钟内，此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色，后 3-4 孔梯度不明显，即可终止）。

7. 依序每孔加终止溶液 50ul，终止反应（此时蓝色立转黄色）。终止液的加入顺序应尽量与底物液的加入顺序相同。为了保证实验结果的准确性，底物反应时间到后应尽快加入终止液。

8. 用酶联仪在 450nm 波长依序测量各孔的光密度（OD 值）。在加终止液后 15 分钟以内进行检测。

注：

1. 用户在初次使用试剂盒时，应将各种试剂管离心数分钟，以便试剂集中到管底。

2. 每次实验留一孔作为空白调零孔，该孔不加任何试剂，只是最后加底物溶液及 2N H₂SO₄。

测量时先用此孔调 OD 值至零。

3. 为防止样品蒸发，试验时将反应板放于铺有湿布的密闭盒内，酶标板加上盖或覆膜。

4. 未使用完的酶标板或者试剂，请于 2-8℃ 保存。标准品、生物素标记抗体工作液、辣根过氧化物酶标记亲和素工作液请依据所需的量配置使用。请勿重复使用已稀释过的标准品、生物素标记抗体工作液或、辣根过氧化物酶标记亲和素工作液。

5. 建议检测样品时均设双孔测定，以保证检测结果的准确性。

洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将推荐的洗涤缓冲液至少 0.3ml 注入孔内，浸泡 1-2 分钟。根据需要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

计算

以标准物的浓度为横坐标（对数坐标），OD 值为纵坐标（普通坐标），在半对数坐标纸上绘出标准曲线，根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

注意事项

1. 当混合蛋白溶液时应尽量轻缓，避免起泡。
2. 洗涤过程非常重要，不充分的洗涤易造成假阳性。
3. 一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。
4. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。
5. 如标本中待测物质含量过高，请先稀释后再测定，计算时请最后乘以稀释倍数。
6. 在配制标准品、检测溶液工作液时，请以相应的稀释液配制，不能混淆。
7. 底物请避光保存。

8. 不要用其它生产厂家的试剂替换试剂盒中的试剂。