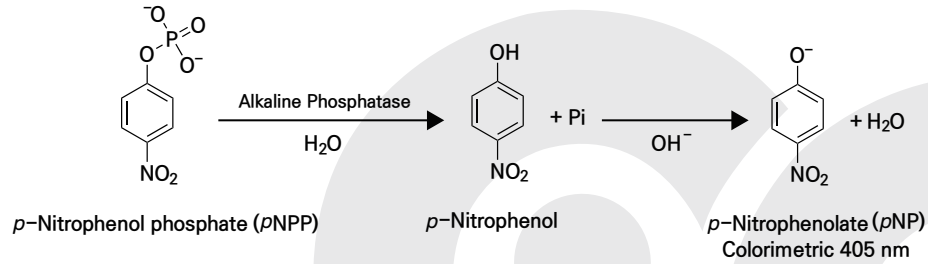


PicoSens™ Alkaline Phosphatase Activity Assay Kit (Colorimetric)

(BM-ALK-500, 500 assays, Store at -20°C)

실험 원리



BIOMAX PicoSens™ Alkaline Phosphatase Activity Assay Kit (Colorimetric)에서 p-Nitrophenyl phosphate(pNP-P)는 Sample 내에 존재하는 Alkaline Phosphatase(ALP)의 작용에 의해 떨어져 p-Nitrophenol로 변환되고, 이후 염기성 조건에서 p-Nitrophenolate(pNP)로 변환되어 흡광도 405 nm에서 측정 가능합니다. 이를 통해 Sample 내에 존재하는 ALP의 Activity를 측정할 수 있습니다.

제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
5X ALP Assay Buffer	20 ml	-20°C
ALP Substrate	10 Tablets	
ALP Positive Control	20 µl	
ALP Stop Solution	10 ml	

* 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 -20°C 보관 시 약 1년간 안정적입니다.

검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 96-well Microplate (Clear, Flat bottom)
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ 15 ml Conical tube
- ▶ D.W.
- ▶ Microplate reader (405 nm Filter)
- ▶ Ice bucket
- ▶ 8 or 12 Channel micropipette
- ▶ Reservoir
- ▶ Microtube

실험 전 준비사항 및 보관방법

- ▶ 제품의 모든 구성품은 상온에서 놔두어 완전히 녹인 후 사용합니다.
- ▶ Vial 뚜껑 내부에 시약이 묻어 있을 수 있으니 개봉 전 원심분리 합니다.
- ▶ 빛이 차단된 상태로 보관합니다.
- ▶ **5X ALP Assay Buffer** : 사용 전 D.W.에 5배 희석하여 1X ALP Assay buffer를 만들어 사용합니다. 희석 후 4°C에 보관합니다. ex) 5X Assay Buffer : D.W. = 2 ml : 8 ml
- ▶ **ALP Substrate** : ALP Substrate에는 pNPP가 포함되어 있습니다. Substrate 2 tablets를 5.4 ml의 1X ALP Assay buffer에 녹여 5 mM pNPP를 제조합니다. (100 assays 용량입니다.)
* Tablet은 절대 맨손으로 만지지 않도록 주의합니다.
- ▶ **ALP Positive Control** : 실험 직전, ALP Positive Control 20 µl에 D.W. 1980 µl를 첨가하여 완전히 녹인 후 1회 사용량만큼 Aliquot하여 4°C에 보관합니다. (ALP Positive Control은 1 Well당 10 µl씩 사용됩니다.)
* 실험 시 얼음에 꽂아 사용하며 남은 ALP Positive Control은 재사용이 불가능합니다. Aliquot한 ALP Positive Control은 4°C에서 2 개월간 사용 가능합니다.

Sample type

- Serum, Plasma, Urine
- Tissue
- Cell culture : Adherent or Suspension cells, Supernatant

Sample preparation

- * 미지의 Sample 또는 처음 측정하는 Sample의 경우 측정값이 Standard curve 내에 위치하도록 예비실험 진행 후 사용을 권장합니다.
- * Sample 준비 과정에서 EDTA, Oxalate, Fluoride, Citrate가 포함되어 있을 경우 ALP를 Inhibition하여 결과값에 영향을 줄 수 있습니다.

Serum, Plasma, Urine

1X ALP Assay buffer로 희석시켜 바로 사용 가능합니다.

Tissue

10 mg의 Tissue를 Microtube에 담아 Tissue의 4~6배의 1X ALP Assay buffer를 첨가합니다. Microtube를 Ice에서 Homogenize 합니다. 4°C에서 최고속도(x12,000 g 이상)로 15 min Centrifuge 후 상층액만 새로운 Microtube에 옮겨 담습니다. 실험 전까지 4°C에 보관합니다.

Cell

1 x 10⁵ 이상의 Cell을 Cold PBS로 Wash 한 후, 상층액을 제거합니다. 50 μℓ의 1X ALP Assay buffer를 첨가하여 Ice에서 Homogenize 합니다. 4°C에서 최고속도로 15 min 원심분리 후 상층액만 새로운 Micro-tube에 옮겨 담습니다. 실험 전까지 4°C에 보관합니다.

Culture supernatant

1X ALP Assay buffer로 희석시켜 바로 사용 가능합니다.

Standard preparation

40 μℓ의 5 mM pNPP와 160 μℓ의 1X ALP Assay buffer를 혼합하여 1 mM pNPP를 제조합니다. 1 mM pNPP를 다음과 같이 첨가하여 Standard curve를 그립니다.

STD No.	1 mM pNPP (μℓ)	1X ALP Assay buffer (μℓ)	Final volume Standard in well (μℓ)	Final amount pNP in well (nmol/well)
Blank	0	300	120	0
2	10	290	120	4
3	20	280	120	8
4	30	270	120	12
5	40	260	120	16
6	50	250	120	20

* Duplicate 기준 용량입니다.

실험 과정

* Duplicate 또는 Triplicate로 진행합니다.

* 매 실험마다 Standard를 새로 그립니다.

① Standard well에 준비한 Standard를 120 μℓ씩 첨가합니다.

② Sample well에 준비한 Sample 80 μℓ와 5 mM pNPP 50 μℓ를 첨가합니다.

* Sample background control

색이 있는 Media를 사용한 경우, 앞서 준비된 Sample의 희석 비율과 동일하게 Media를 희석합니다. 희석한 Media 80 μℓ와 5 mM pNPP 50 μℓ를 넣고, 즉시 Stop Solution 20 μℓ를 첨가하여 반응을 중단시킵니다.

ex) Sample 희석 비율이 Sample 20 μℓ + 1X ALP Assay buffer 60 μℓ 일 경우,

Sample background control은 Media 20 μℓ + 1X ALP Assay buffer 60 μℓ로 첨가

③ Standard well에 준비한 ALP Positive Control 10 μℓ를 첨가합니다.

④ 차광하여 37 °C에서 60 min간 반응시킨 후, Standard well과 Sample well에 Stop Solution 20 μℓ를 첨가합니다.

* Sample background well에는 Stop Solution을 추가로 첨가하지 않습니다.

⑤ Microplate reader로 흡광도 405 nm에서 측정합니다.

결과 분석

- 각 Standard well과 Sample well의 Duplicate 또는 Triplicate 측정값의 평균값을 구합니다.

- 모든 측정값에서 Blank의 값을 뺍니다.

* Sample에 색이 있는 Media를 사용했을 경우, Sample 값에서 Sample background control 값을 추가로 뺍니다.

- Standard 흡광도 값으로 Standard curve를 그립니다.

- Sample의 흡광도 값이 2.5를 넘어가면 Sample을 희석하여 다시 실험을 진행합니다.

- Standard curve 식에 Sample의 흡광도 값을 대입하여 구한 pNP의 양으로 다음 식을 이용하여 시료 내 ALP의 Activity를 구합니다.

- 여기서 정의되는 Unit수는 DEA Units입니다.

DEA Units : pH 9.8, 37°C의 Diethanolamine Buffer에서 1 min 당 1 μmol의 pNPP를 변환시키는 효소의 양

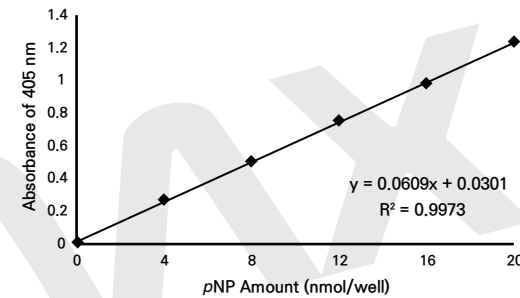
$$\text{ALP Activity (U/ml)} = \frac{B}{TxV} \times D$$

B : Sample에서 측정된 흡광도를 Standard curve에 대입하여 도출한 pNP의 양 (μmol)

T : Time (min)

V : 첨가한 Sample volume (ml)

D : Sample 희석 배율



pNP Standard curve (Colorimetric)

Related products

BM-ALT-100

PicoSens™ ALT Assay Kit (Colorimetric)

BM-AST-100

PicoSens™ AST Assay Kit (Colorimetric)

* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.