

研究用試薬

2021 年 2 月 1 日作成

この度は弊社製品をご購入いただきましてありがとうございます。ご使用に際してはキットに同梱された取扱説明書に従って測定を実施してください。

『 ラボアッセイ™ ALP 』 取扱説明書

(p-ニトロフェニルりん酸基質法によるアルカリホスファターゼ活性測定キット)

試験研究用試薬であり体外診断用に用いることはできません

1.はじめに

アルカリホスファターゼ (ALP) は肝臓をはじめ、骨、小腸などに広く分布している酵素です。特に骨代謝の研究分野では骨形成マーカーの 1 つとして用いられています。

本品は p-ニトロフェニルりん酸を基質としたアルカリホスファターゼ活性測定キットで、マイクロプレートリーダーによる多検体測定に有用です。

2.キット構成試薬

構 成 試 薬		状 態	容 量
(1)	基質錠 (溶解時 p-ニトロフェニルりん酸二ナトリウム 6.7 mmol/L)	固形	10 錠
(2)	基質溶解液 (2.0 mmol/L 塩化マグネシウム含有 0.1 mol/L 炭酸塩緩衝液 pH 9.8)	溶液	50 mL/1 本
(3)	反応停止液 (0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液)	溶液	50 mL/1 本
(4)	標準液 (0.5 mmol/L p-ニトロフェノール溶液)	溶液	5 mL/1 本

※マイクロプレート法の場合、測定回数は 500 回

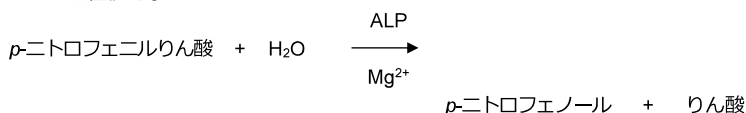
※基質錠は 1 錠余分に入っています。

3.キットの保存と使用期限

2℃～10℃で保存し、凍結させないでください。使用期限はキット外箱のラベルに記載しています。

4.測定原理

p-ニトロフェニルりん酸を含む炭酸塩緩衝液 (pH 9.8) 中で検体を作用させると、検体中のアルカリホスファターゼにより p-ニトロフェニルりん酸は p-ニトロフェノールとりん酸に分解され、生成した p-ニトロフェノールはアルカリ性側で黄色を呈します。この 405 nm の吸光度を測定することにより検体中のアルカリホスファターゼ活性値を求めます。



5.キット以外に必要な器具・器材

- 96 ウェルの透明マイクロプレート
- マイクロピペット
- 試験管またはマイクロチューブ
- ピペット
- 恒温槽 (37 °C) *
- プレートミキサー *
- マイクロプレートリーダー (405 nm 吸光フィルター)
- (* : マイクロプレートリーダーの機種によっては不要です)

6.試薬の調製法

- ① 基質緩衝液 : 基質錠 1 錠を基質溶解液 5 mL で溶解します。
* 錠剤は予め砕いておくとう容易に溶解します。
* 調製後は 2 °C ~ 10 °C 遮光保存で 2 週間使用できます。
- ② 反応停止液 : そのままお使いください。
- ③ 標準液希釈系 : 標準液を蒸留水で順次倍々希釈し、0.5、0.25、0.125、0.0625 mmol/L の 2 倍希釈系列を調製します。

濃度(mmol/L)	0.5	0.25	0.125	0.0625	0
標準液(μL)	原液: 60	原液:60	60*	60*	0
蒸留水(μL)	0	60	60	60	60

* : ひとつ高濃度の標準溶液

7.検体の調製および使用上の注意

- 検体として血清／血漿を用いる場合は、採血後なるべく速やかに測定してください。
- 採取後長期に保存する場合は -35 °C 以下で凍結保存してください。
- 抗凝固剤の EDTA は負誤差を与えますので使用しないでください。
- りん酸塩は負誤差を与えますので、混入しないように注意してください。
- ビリルビン、溶血は測定値にほとんど影響を与えません。
- 検体を希釈する必要がある場合は蒸留水または適当な緩衝液で希釈してください。ただし、りん酸系の緩衝液は使用しないでください。
- 試薬は指定された保存条件で保管し、使用期限の過ぎたものは使用しないでください。
- 直射日光を避けて操作してください。
- 試薬採取の際、ピペットからの汚染に注意してください。
- 試薬にはフェノール類および水酸化ナトリウムが含まれていますので取り扱いには十分注意してください。
- 本品は体外診断用としては使用できません。

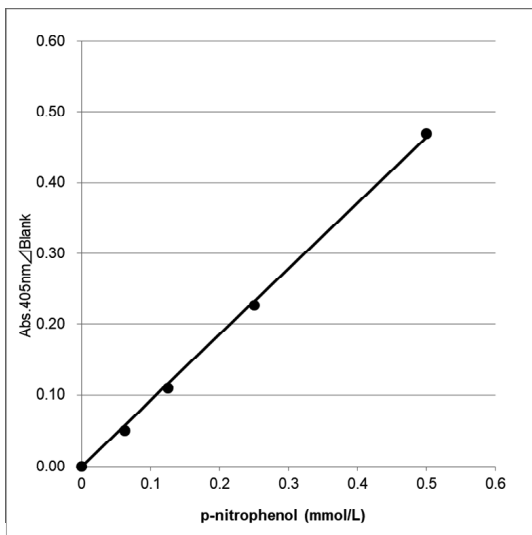
8.測定操作法

下記に従って、反応させてください。

	テスト	スタンダード	ブランク
基質緩衝液	100 μL	100 μL	100 μL
試料	検体 20 μL	標準液 20 μL	蒸留水 20 μL
プレートミキサーで 1 分間攪拌後、37 °C 15 分間インキュベート			
反応停止液	80 μL	80 μL	80 μL
プレートミキサーで 1 分間攪拌後、405 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定する。			

9. 標準曲線

標準操作法のスタンダードに従って得られた標準曲線の例



10. ユニットの定義

前述の条件下、pH 9.8、37 °Cで、1 分間に 1 nmol の *p*-ニトロフェノールを生成する酵素活性を 1 unit とする。

$$\text{活性(units/}\mu\text{L)} = \frac{C}{15} \times a$$

C: 標準曲線から得られる吸光度 ($A_{\text{テスト}} - A_{\text{ブランク}}$) に対する *p*-ニトロフェノール濃度 (mmol/L=nmol/μL)

15: 反応時間 (分)

a: 検体の希釈倍数

必要に応じて検体中のタンパク質量または DNA 量を測定し、単位タンパク質量 (DNA 量) あたりに換算してください。

$$\text{units/}\mu\text{g protein または DNA} = \frac{\text{活性 (units/}\mu\text{L)}}{\text{タンパク質量または DNA 濃度 (}\mu\text{g/}\mu\text{L)}}$$

11. キットの性能

- 測定範囲: > 0.06 mmol/L
- 標準曲線範囲: > 0~0.5 mmol/L
(0.5 mmol/L 以上の直線性も確認していますので外挿して求めることができます。)
- 再現性: C.V. < 10 %

【参考文献】

Yamamoto, M., Takahashi, Y., Tabata, Y.: *Biomaterials*. 24(24), 4375(2003).

【測定名】	
【所属】	
【測定者】	【測定日】
【ロット番号】	【有効期限】
【備考】	

【製品名】	ラボアッセイ ™ ALP		
【シバヤギコード】	LABALP-M1	【和光コード】	633-51021
【英語表記】	LabAssay™ ALP (LABALP-M1, FUJIFILM Wako Shibayagi, Gunma, Japan)		
【お問い合わせ先】			

製造	富士フイルムワコーシバヤギ株式会社 〒377-0007 群馬県渋川市石原 1062-1 TEL.0279-25-0279 FAX.0279-23-0313 <E-mail>wksb-info@fujifilm.com <URL> http://www.shibayagi.co.jp
販売	富士フイルム 和光純薬株式会社

LabAssay™ ALP

(Alkaline Phosphatase activity assay with *p*-Nitrophenylphosphate as a substrate)

For Research Use Only Not for use in diagnostic procedure

[Introduction]

Alkaline Phosphatase (ALP) is distributed in a variety of tissues such as liver, bone, and small intestine in animals. The change of the enzyme activity in tissues is an important hallmark for physiological phenomena as osteogenesis and so on. This kit is for Alkaline Phosphatase assay in a simultaneous multi-sample assay format with a microplate using *p*-Nitrophenylphosphate as a substrate.

[Kit contents]

	Kit contents	State	Amount
(1)	Substrate Tablet (<i>p</i> -Nitrophenylphosphate Disodium 6.7 mmol/L, after dissolving)	tablet	10 tablets
(2)	Buffer Solution (2.0 mmol/L MgCl ₂ , 0.1 mol/L Carbonate Buffer, pH 9.8)	liquid	50 mL/1 bottle
(3)	Stop Solution (0.2 mol/L Sodium Hydroxide Solution)	liquid	50 mL/1 bottle
(4)	Standard Solution (0.5 mmol/L <i>p</i> -Nitrophenol Solution)	liquid	5 mL/1 bottle

※Assay in microplate format;500 tests.

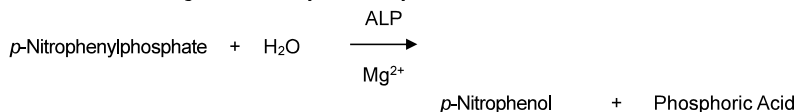
※Substrate Tablet contains one spare tablet.

[Storage and expiration]

When the complete kit is stored at 2 °C ~ 10 °C, the kit is stable until the expiration date shown on the label on the container.

[Assay principle]

p-Nitrophenylphosphate is hydrolyzed into *p*-Nitrophenol and Phosphoric Acid in the carbonate buffer (pH 9.8) in the presence of Alkaline Phosphatase in sample. Released *p*-Nitrophenol showing yellow color is optically measured at 405 nm wavelength as the enzyme activity.



[Materials and apparatuses prepared]

- 96 well microplate (transparent type) ·Micropipette ·Pipette ·Test tube
- Plate mixer * ·Incubator maintaining at 37 °C *
- Microplate reader with 405 nm wavelength filter
- (* if the microplate reader is not equipped.)

[Preparation of reagents]

- ① Working Assay Solution :

Dissolve a Substrate Tablet into 5 mL of Buffer Solution provided.

* It is easy to dissolve the tablet crashed into pieces.

* Can be stored for two weeks at 2 °C~10 °C in the dark after reconstitution.

② Stop Solution : Ready-to-use

③ Dilution series of Standard Solution : Dilute Standard Solution seriously with distilled water, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mmol/L.

Conc.(mmol/L)	0.5	0.25	0.125	0.0625	0
Standard solution(μL)	Original std. sol.: 60	Original std. sol.:60	60*	60*	0
Distilled water(μL)	0	60	60	60	60

* One rank higher standard solution

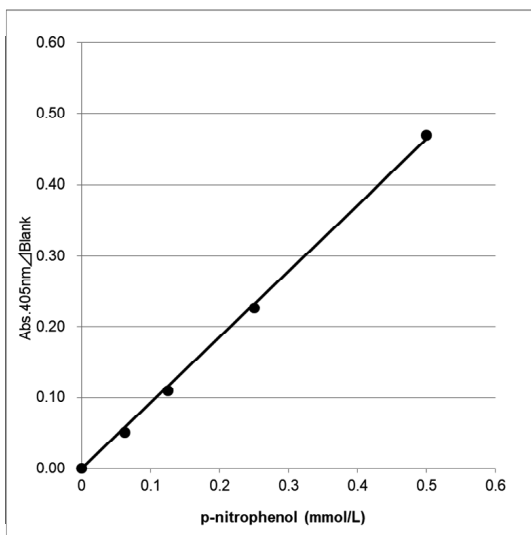
[Procedure]

Perform the assay in the wells according to the following table scheme.

	Test	Standard	Blank
Working Assay Solution	100 μL	100 μL	100 μL
Sample	Sample 20 μL	Dilution series 20 μL	Distilled water 20 μL
Shake for 1 minute by plate mixer and incubate for 15 minutes at 37 °C			
Stop Solution	80 μL	80 μL	80 μL
Shake for 1 minute by plate mixer and measure the absorbance at 405 nm of wavelength using microplate reader.			

[Standard curve]

The example of standard curve is as follows according to the procedure of standard.



[Unit Definition]

According to the above conditions, one unit of the enzyme activity is defined as release of 1 nmol *p*-Nitrophenol per minute at pH 9.8, 37 °C.

$$\text{Activity (units/}\mu\text{L)} = \frac{C}{15} \times a$$

C : Concentration of *p*-Nitrophenol released by sample, which is calculated as $A_{\text{test}} - A_{\text{blank}}$
(mmol/L=nmol/ μ L)

15 : Reaction Time (min.)

a : Dilutin factor of sample

The relative activity of sample can be determined as follows.

$$\text{units/}\mu\text{g protein or DNA} = \frac{\text{Activity (units/}\mu\text{L)}}{\text{Protein or DNA concentration (}\mu\text{g/}\mu\text{L)}}$$

[Features]

Dynamic assay range : > 0.06 mmol/L

Standard assay range : 0~0.5 mmol/L

(The activity at concentration more than 0.5 mmol/L can be determined by extrapolation due to its linearity.)

Reproducibility : C.V. < 10 %

[Notes]

- Serum sample should be used immediately after collecting blood. Do not use EDTA as an anticoagulant in preparation of blood sample, because of reduction of the activity by the reagent.
- Avoid unnecessary contamination of phosphate in the assay, because of reduction of the activity.
- Bilirubin and materials generated by hemolysis may not significantly affect the assay.
- In dilution of sample, use distilled water or an appropriate buffer, but not phosphate buffer.
- Keep reagents provided indicated condition, before their expiration.
- Avoid exposure of the reagents to direct sunlight.
- Be careful contamination during pipette solutions.
- Be careful of handling of hazardous solutions such as phenols, sodium hydroxide.
- This kit is for biochemical research, but not for diagnostic use.

[Reference]

Yamamoto, M., Takahashi, Y., Tabata, Y.: *Biomaterials*. 24(24), 4375(2003).

LabAssay™ ALP

[Storage condition] Store the kit at 2 °C ~ 10 °C

[Manufacture #] LABALP-M1

[Cat #] 633-51021

This kit is
manufactured by

FUJIFILM Wako Shibayagi Corporation

1062-1 Ishihara, Shibukawa, Gunma, Japan 377-0007

TEL.+81-279(25)0279, FAX.+81-279(23)0313

<E-mail>wksb-info@fujifilm.com <URL><http://www.shibayagi.co.jp>

distributed by

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation