

Wako**LabAssay™ ALP**(Alkaline Phosphatase activity assay with
p-Nitrophenylphosphate as a substrate)**[Preface]**

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]

Substrate Tablet 20 tablets
(*p*-Nitrophenylphosphate Disodium 6.7 mmol/L, after dissolving)

Buffer Solution 100 mL
(2.0 mmol/L MgCl₂, 0.1 mol/L Carbonate Buffer, pH 9.8)

Stop Solution 100 mL
(0.2 mol/L Sodium Hydroxide Solution)

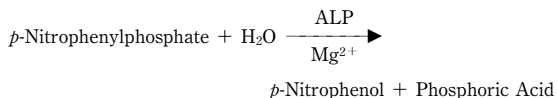
Standard Solution 10 mL
(0.5 mmol/L *p*-Nitrophenol Solution)

[Materials and apparatuses prepared]

- 96 well microplate (transparent type)
 - Test tube
 - Pipette
 - Microplate reader with 405 nm wavelength filter
 - Incubator maintaining at 37℃*
 - Plate mixer*
- (* : If the microplate reader is not equipped.)

[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.

**[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 2~10℃ 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.

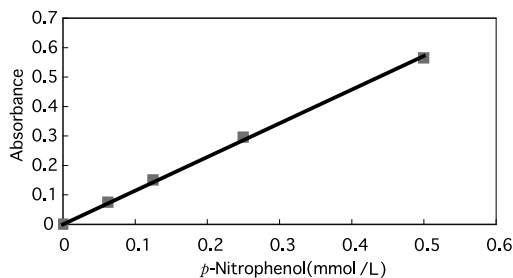
[Procedure]

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

	Test	Blank	Standard
Working Assay Solution	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Sample	(Sample) 20 μ L	(Distilled water) 20 μ L	(Dilution series) 20 μ L
Shake for 1 minute by plate mixer and incubate for 15 minutes at 37℃.			
Stop Solution	80 μ L	80 μ L	80 μ L
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.



[By the microplate reader : SAFIRE (TECAN Austria GmbH)]

[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 : Dilution 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.

[Storage]

Store at 2~10°C

[Expiration date]

1 year after the production

[Package]

900 tests

[Reference]

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

Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : +81-6-6203-3741
Facsimile : +81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

Wako Chemicals USA, Inc.

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : +1-804-271-7677
Facsimile : +1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

Wako Chemicals GmbH

Nissanstraße 2
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : +49-2131-311-0
Facsimile : +49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

ラボアッセイ™ ALP

(*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)

〔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。

〔キットの内容〕

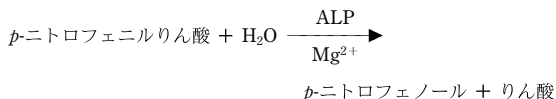
基質錠	20錠
(溶解時 <i>p</i> -ニトロフェニルりん酸二ナトリウム 6.7 mmol/L)	
基質溶解液	100 mL
(2.0 mmol/L 塩化マグネシウム含有 0.1 mol/L 炭酸塩緩衝液 pH 9.8)	
反応停止液	100 mL
(0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液)	
標準液	10 mL
(0.5 mmol/L <i>p</i> -ニトロフェノール溶液)	

〔キット以外に必要なもの〕

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

〔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。



〔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容易に溶解します。
*調製後は 2~10℃ 遮光保存で 2 週間使用できます。
- ② 反応停止液：そのままお使い下さい。
- 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。

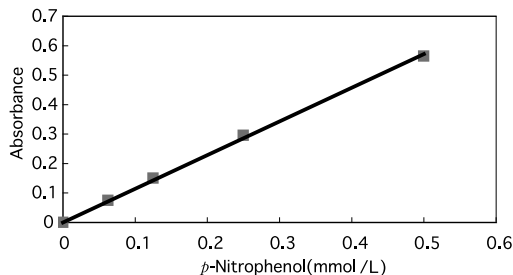
〔標準操作法〕

下記に従って各々ウェル中で反応させて下さい。

	テスト	ブランク	スタンダード
基質緩衝液	100 μ L	100 μ L	100 μ L
試料	(検体) 20 μ L	(蒸留水) 20 μ L	(標準液希釈系) 20 μ L
プレートミキサーで 1 分間攪拌後、37℃ 15 分間インキュベート			
反応停止液	80 μ L	80 μ L	80 μ L
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。			

〔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



〔使用マイクロプレートリーダー：サファイア (TECAN Austria GmbH)〕

〔ユニットの定義〕

前述の条件下、pH 9.8、37℃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/ μ L)

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又は DNA 量を測定し、単位タンパク質量 (DNA 量) あたりに換算して下さい。

$$\text{units/}\mu\text{g protein 又は DNA} = \frac{\text{活性 (units/}\mu\text{L)}}{\text{タンパク質又は DNA 濃度 (}\mu\text{g/}\mu\text{L)}}$$

〔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%

〔使用上の注意〕

- 検体として血清を用いる場合は、採血後なるべく速やかに測定して下さい。その際、EDTA は負誤差を与えますので抗凝固剤として用いないで下さい。
- りん酸塩は負誤差を与えますので、混入しないよう注意して下さい。
- 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又は適当な緩衝液で希釈して下さい。但し、りん酸系の緩衝液は使用しないで下さい。
- 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下さい。
- 直射日光を避けて操作して下さい。
- 試薬採取の際、ピペットからの汚染に注意して下さい。
- 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扱いには十分注意して下さい。
- 本品は体外診断用としては使用できません。

〔保存条件〕

2～10℃ 保存

〔使用期限〕

製造後 1 年

〔包 装〕

900 回用

〔参考文献〕

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

和光純薬工業株式会社

大阪市中央区道修町 3 - 1 - 2
電 話 (06) 6203 - 3741 (代 表)

0312K01