



## 碱性磷酸酶检测试剂盒(PNP 比色法)

### 产品简介:

碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, 简称 ALP 或 AKP)为一类磷酸酯酶, 广泛分布于哺乳动物组织内, 其活性所需最适 pH 9.2~9.8。此酶主要存在于物质交换活跃之处(细胞膜), 如肠上皮和肾近曲小管的刷状缘、附睾上皮之静纤毛、肝的毛细胆管膜以及微动脉和毛细血管动脉部之内皮, 还见于内质网、高尔基复合体、吞饮小泡、肠上皮之溶酶体、中性粒细胞之中性颗粒以及平滑肌的细胞膜。

NOVON 碱性磷酸酶检测试剂盒(PNP 比色法)(Alkaline Phosphatase Colorimetric Assay Kit)采用 PNP 比色法, 其检测原理是 Para-nitrophenyl phosphate (pNPP) 为一种常用的磷酸酶显色底物, 在酸性条件下, 可在碱性磷酸酶的作用下生成 p-nitrophenol。在碱性条件下 p-nitrophenol 转变成醌式结构, 呈较深的黄色, 产物黄色越深, 说明碱性磷酸酶活性越高, 反之则酶活性越低, 通过分光光度比色法测定 400~415nm 处吸光度, 据此通过比色分析就可以计算出碱性磷酸酶活性水平。该试剂盒可用于检测细胞或组织的裂解液或匀浆液、血浆、血清、尿液等样品中内源性的碱性磷酸酯酶活性。该试剂盒仅用于科研领域, 不宜用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成:

名称	SS1499 60T	保存条件
试剂(A): ALP Assay buffer	50ml	4℃
试剂(B): pNPP	2 支	-20℃ 避光
试剂(C): p-nitrophenol (10mM)	0.2ml	-20℃ 避光
试剂(D): Stopping Solution	75ml	RT
说明书	1 份	

### 自备材料:

- 1、比色杯
- 2、水浴锅或恒温箱
- 3、分光光度计

### 操作步骤(仅供参考):

#### 1、配制检测工作液:

- ① 配制显色工作液: 取出 1 支 pNPP, 恢复至室温后溶解于 2ml ALP Assay buffer, 混匀, 冰上预冷备用。新配制的显色工作液应在 6h 内用完。
- ② 配制标准品工作液: 取出 p-nitrophenol (10mM) 恢复至室温后, 取 0.05ml 溶解于 0.95ml ALP Assay buffer, 使浓度达到 0.5mM。

#### 2、准备样品:

- ① 细胞或组织样品: 取恰当细胞或组织裂解液, 如果有必要需进行适当匀浆, 低速离心取上清, -20℃冻存, 用于碱性磷酸酯酶的检测。



② 血浆、血清和尿液样品：血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于本试剂盒的测定，尿液通常也可以直接用于测定，-20℃冻存，但为了消除样品本身颜色的干扰，需设置加了血浆或血清但不加底物的对照。

③ 高活性样品：如果样品中含有较高活性的碱性磷酸酶，可以使用原有的裂解液或 PBS 等进行稀释，也可以采用 ALP Assay buffer 稀释。

3、加样：按照下表设置空白对照、标准品、待测样品，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡。标准品的用量分别为 0.05、0.1、0.2、0.25、0.4、0.5ml，待测样品直接加 0.5ml。如果样品中的酸性磷酸酯酶活性过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定。样品的检测最好能设置平行管。

	空白对照管	标准品管	待测样品管
ACP Assay buffer	0.5ml	(0.5-x)ml	(0.5-y)ml
显色工作液	0.5ml	0.5ml	0.5ml
待测样品	——	——	yml
标准品工作液	——	xml	——

4、轻轻混匀，37℃孵育 20min。

5、每孔加入 1.0ml Stopping Solution 终止反应。

6、检测 410nm 处吸光值，如果无法检测 410nm，亦可检测 400~415nm 范围内吸光值，一般应数小时内检测完毕。

碱性磷酸酶活性单位的定义：在 pH9.8 的缓冲液中，37℃条件下，每分钟水解 para-nitrophenyl phosphate 显色底物产生 1 微摩尔 p-nitrophenol 所需的碱性磷酸酶的量定义为一个酶活力单位。根据酶活性定义，计算出样品中的酸性磷酸酯酶活性。

女性：1~12 岁 <500U/L

15 岁以上 40~150U/L

男性：1~12 岁 <500U/L

12~15 岁以上 <750U/L

25 岁以上 40~150U/L

## 注意事项：

- 1、待测样品中不能含有磷酸酶抑制剂，同时需避免反复冻融。
- 2、建议每次测定时都做标准曲线，以使标准更准确，另外标准品需避免反复冻融。
- 3、如果没有酶标仪，也可以使用普通的分光光度计测定，但应考虑根据比色杯的最小检测体积，尽量采用小体积的比色杯。
- 4、所测样本的值高于标准曲线的上限，应用 ALP Assay buffer 稀释样品后重新测定。
- 5、一支显色工作液配制后需当日使用完毕，因此请注意适当多准备一些样品一起检测。
- 6、p-nitrophenol 溶液对人体有害，反应终止液有腐蚀性，请小心操作。
- 7、如果希望进行酶活性的绝对定量，进行酶反应时应精确计时，此时推荐采用孵育 30min



或更长时间，以减小操作过程中的时间误差。

8、待测样品中碱性磷酸酶活性较低时，可适当延长孵育时间至 30min。

9、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**有效期：**12 个月有效。