



## 碱性磷酸酶检测试剂盒(PNP 微板法)

### 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。

源叶生物 碱性磷酸酶检测试剂盒(PNP 微板法)(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, 通过比色法(酶标仪)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, 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酶活性。该试剂盒仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

### 组成:

名称 \ 编号	R22099 100T	Storage
试剂(A): ALP Assay Buffer	15ml	4℃
试剂(B): pNPP	2 支	-20℃ 避光
试剂(C): <i>p</i> -nitrophenol(10mM)	0.1ml	-20℃ 避光
试剂(D): Stopping Solution	15ml	RT
使用说明书	1 份	



## 自备材料:

- 1、水浴锅或恒温箱
- 2、96 孔板
- 3、酶标仪

## 操作步骤(仅供参考):

### 1、准备样品:

①细胞或组织样品: 取恰当细胞或组织裂解液, 如果有必要可用 PBS 或生理盐水进行适当匀浆, 一般细胞数量在  $10^6$  以上, 组织应在 100mg 以上, 3000~4000g 离心取上清,  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存, 用于碱性磷酸酶的检测。

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该试剂盒的测定, 尿液通常也可以直接用于测定,  $-20^{\circ}\text{C}$  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。

2、配制显色工作液: 取出 1 支 pNPP, 恢复至室温后溶解于 2.5ml 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。

3、配制标准品工作液: 取出 *p*-nitrophenol(10mM)恢复至室温后, 取 10 $\mu$ l 溶解于 190 $\mu$ l ALP Assay Buffer, 使浓度达到 0.5mM 即获得 *p*-nitrophenol (0.5mM), 该试剂- $20^{\circ}\text{C}$  保存 2 周有效。用 *p*-nitrophenol(0.5mM)按下表继续稀释标准品:

加入物( $\mu$ l)	1	2	3	4	5	6
ALP Assay Buffer	90	80	60	50	20	0
<i>p</i> -nitrophenol(0.5mM)	10	20	40	50	80	100
<i>p</i> -nitrophenol 浓度( $\mu$ M)	50	100	200	250	400	500

4、ALP 加样: 按照下表设置 96 孔板空白孔、标准孔、测定孔, 溶液应按照规定顺序依次加入, 并注意避免产生气泡。如果样品中的碱性磷酸酶活性过高, 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孔。



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: [shyysw@sina.com](mailto:shyysw@sina.com)

加入物( $\mu$ l)	空白孔	标准孔	测定孔
ALP Assay Buffer	50	—	—
标准品工作液(1~6 号)	—	50	—
待测样品	—	—	50
显色工作液	50	50	50
混匀, 37℃ 孵育 20min			
Stopping Solution	100	100	100

5、ALP 测定: 以空白调零, 酶标仪测定 410nm 处空白管、标准管、测定管的吸光度, 如果无法检测 410nm, 亦可检测 400~415nm 范围内吸光度, 一般 15min 内检测完毕。

### 计算:

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。加入 50 $\mu$ l 的 1 号标准管物质时, 其酶活力单位为 50uM/20min=2.5U/L, 依次类推, 加入浓度分别为 100 $\mu$ M、200 $\mu$ M、250 $\mu$ M、400 $\mu$ M、500 $\mu$ M 的 *p*-nitrophenol, 活力依次为 5、10、12.5、20、25U/L。以酶活力为横坐标, 以对应的吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 根据酶活性定义, 计算出样品中的碱性磷酸酶活性。

### 参考区间(37℃, 健康人):

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



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: [shyysw@sina.com](mailto:shyysw@sina.com)

---

### 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、1 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。