

碱性蛋白酶 (Alkaline protease, AKP) 活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

AKP 是指在碱性条件下催化蛋白质肽键水解的酶类, 属于丝氨酸蛋白酶。此外, 该酶还能够水解酯键、酰胺键, 具有转酯及转肽的功能。该酶是主要工业用酶之一, 广泛应用于制药、丝绸、食品、制革等行业。

测定原理:

在碱性条件下, AKP 水解酪蛋白生成酪氨酸; 在碱性条件下, 酪氨酸还原磷钼酸生成钨蓝; 钨蓝在 680nm 有特征吸收峰, 测定 680nm 吸光度增加速率, 来计算 AKP 活性。

组成:

产品名称	PI005-50T/24S	Storage
试剂一: 液体	90ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	4°C避光
试剂四: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂五: 液体	10ml	4°C
标准品: 液体	1ml	4°C
说明书	一份	

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4°C保存。临用前加 10 ml 蒸馏水溶解。

试剂三: 粉剂×1 瓶, 4°C避光保存。临用前加入 20 ml 试剂一, 沸水浴中磁力搅拌溶解。(可在烧杯上盖一层保鲜膜, 注意观察, 避免水分全部蒸发, 一般加热 15-30 分钟, 该试剂为过饱和试剂, 充分混匀后仍出现颗粒物不溶物不影响使用)。

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4°C保存。临用前加 50 ml 蒸馏水溶解。

标准品: 液体 1ml×1 支, 0.25 μ mol/ml 标准酪氨酸溶液, 4°C保存。

自备仪器和用品:

可见分光光度计、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪、1.5 ml EP 管、1ml 玻璃比色皿和蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g) : 试剂一体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 冰浴匀浆, 8000g, 4°C离心 10min, 取上清, 即粗酶液。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



- 血清或培养液：直接测定。
- 细菌、真菌：按照细胞数量 (10^4 个)：试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一)，冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min)；然后 8000g，4°C，离心 10min，取上清置于冰上待测。

测定操作：

- 分光光度计预热 30min，调节波长到 680 nm，蒸馏水调零。
- 试剂二、试剂三和试剂四置于 40°C 水浴保温 30min。
- 对照管**：取一支 EP 管，加入 100 μ L 粗酶液 (血清或培养液)，200 μ L **试剂二**，混匀后置于 40°C 水浴保温 10min；加入 200 μ L **试剂三**，混匀后 8000g，4°C 离心 10min；取 200 μ L 上清液，加入新的 EP 管，再加入 1000 μ L 试剂四，200 μ L 试剂五，混匀后置于 40°C 水浴保温 20min，于 680nm 测定光吸收，记为 A 对照管。
- 测定管**：取一支 EP 管，加入 100 μ L 粗酶液 (血清或培养液)，200 μ L **试剂三**，混匀后置于 40°C 水浴保温 10min；加入 200 μ L **试剂二**，混匀后 8000g，4°C 离心 10min；取 200 μ L 上清液，加入新的 EP 管，再加入 1000 μ L 试剂四，200 μ L 试剂五，混匀后置于 40°C 水浴保温 20min，于 680nm 测定光吸收，记为 A 测定管。**(注意与对照管不同，先加试剂三，后加试剂二)**
- 空白管**：取一支 EP 管，加入 200 μ L 蒸馏水，1000 μ L 试剂四 200 μ L 试剂五，混匀后置于 40°C 水浴保温 20min，于 680nm 测定光吸收，记为 A 空白管。
- 标准管**：取 EP 管，加入 200 μ L 标准品，1000 μ L 试剂四，200 μ L 试剂五，混匀后置于 40°C 水浴保温 20min，于 680nm 测定光吸收，记为 A 标准管。

注意：空白管和标准管只需要测定一次。

计算公式：

1. 按照样本蛋白浓度计算

AKP 活性单位定义：30°C 每毫克蛋白每分钟水解产生 1nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

AKP 活性 (nmol/min /mg prot) = C 标准品 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \times V 反总 \div (Cpr \times V1) \div T = 125 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \div Cpr

2. 按照样本质量计算

AKP 活性单位定义：30°C 每克样品每分钟催化水解产生 1 nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

AKP 活性 (nmol/min /g 鲜重) = C 标准品 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \times V 反总 \div (W \times V1 \div V2) \div T = 125 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \div W

3. 按照液体体积计算

AKP 活性单位定义：30°C 每毫升样品每分钟催化水解产生 1nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

AKP 活性 (nmol/min/ml) = C 标准品 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \times V 反总 \div V1 \div T = 125 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管)

1. 按照细胞数量计算

AKP 活性单位定义：30°C 每 10^4 个细胞每分钟催化水解产生 1nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

AKP 活性 (nmol/min / 10^4 cell) = C 标准品 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \times V 反总 \div (细胞数量 \times V1 \div V2) \div T = 125 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \div 细胞数量



C 标准品: 0.25 μ mol/ml 标准酪氨酸溶液; V 反总: 酶促反应总体积, 0.5ml; Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/ml); V1: 加入反应体系中粗酶液体积 (ml), 0.1 ml; V2: 提取液总体积 (ml), 1ml; T: 催化反应时间 (min), 10min; W: 样品质量 (g)。

注意事项:

临用前配制的试剂配置好后 3 天内使用完毕。

