

碱性蛋白酶(AKP)活性检测试剂盒说明书

Alkali Proteinase Assay Kit

分光光度法

货号: AK115

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK115-A	35ml×1 瓶	4℃保存
AK115-B	粉剂×1 瓶	4℃保存
AK115-C	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
AK115-D	粉剂×1 瓶	4℃保存
AK115-E	10ml ×1 瓶	4℃保存
AK115-标准品	1ml ×1 支	4℃避光保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 碱性蛋白酶 (Alkali Proteinase, 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。

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。

自备用品:

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

试剂预配制:

AK115-B: 临用前加入 10mL 蒸馏水充分溶解备用

AK115-C: 临用前加入 10mL AK115-A 沸水浴中溶解

AK115-D: 临用前加入 50mL 蒸馏水充分溶解备用

粗酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g) : AK115-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK115-A) 冰浴匀浆, 8000g, 4℃离心 10min, 取上清, 即粗酶液, 置冰上待测。
2. 血清或培养液: 直接测定。
3. 细菌、真菌: 按照细胞数量 (10^4 个) : AK115-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL AK115-A), 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℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

检测步骤:

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长到 680 nm, 蒸馏水调零。
2. AK115-B、C、D 置于 40℃水浴中保温 30min。
3. 按顺序加入下列试剂:

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)	空白管 (ul)	标准管 (ul)
样本	100	100		
AK115-B	200			

AK115-C		200		
混匀后置于 40°C水浴保温 10min				
AK115-B		200		
AK115-C	200			
混匀后 10000rpm 4°C离心 10min, 取上清				
上清	200	200		
蒸馏水			200	
标准品				200
AK115-D	1000	1000	1000	1000
AK115-E	200	200	200	200
混匀后置于 40°C水浴保温 20min, 于 680nm 测定光吸收分别记为 A 对照管、A 测定管、A 空白管、A 标准管。并计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管、 ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。				

注意: 1. 测定管与对照管加样顺序不同, 先加试剂 C, 后加试剂 B

2. 空白管和标准管只需要测定 1-2 次。

计算公式:

1. 按照样本蛋白浓度计算:

AKP 活性单位定义: 40°C每毫克蛋白每分钟催化水解产生 1 μ mol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

AKP 活性 (U/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 稀释倍数 \div (Cpr \times V1) \div T = 625 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div Cpr

注: C 标准品: 0.25 μ mol/mL 标准酪氨酸溶液; 稀释倍数: (100+200+200) \div 200 = 2.5; Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL), 注意该粗酶液不能直接用于蛋白质含量测定, 需要另外测定; 建议称取同样质量的样品, 加入 1mL 蒸馏水匀浆提取离心后, 用本公司蛋白质含量测定试剂盒测定; V1: 加入反应体系中粗酶液 (血清或培养液) 体积, 100 μ L=0.1 mL; T: 催化反应时间, 10min。

2. 按照样本质量计算:

AKP 活性单位定义: 40°C每克样品每分钟催化水解产生 1 μ mol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

AKP 活性 (U/g) = C 标准品 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \times 稀释倍数 \div (W \times V1 \div V2) \div T = 625 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div W

注: C 标准品: 0.25 μ mol/mL 标准酪氨酸溶液; 稀释倍数: (100+200+200) \div 200=2.5; W: 样品质量, g; V1: 加入反应体系中粗酶液体积, 100 μ L=0.1 mL; V2: 粗酶液总体积, 1mL; T: 催化反应时间, 10min。

3. 按照液体体积计算:

AKP 活性单位定义: 40°C每毫升样品每分钟催化水解产生 1 μ mol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

AKP 活性 (U/mL) = C 标准品 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \times 稀释倍数 \div V1 \div T = 625 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管)

注: C 标准品: 0.25 μ mol/mL 标准酪氨酸溶液; 稀释倍数: (100+200+200) \div 200=2.5; V1: 加入反应体系中血清或培养液体积, 100 μ L=0.1 mL; T: 催化反应时间, 10min。

4. 按照细胞数量计算:

AKP 活性单位定义: 40°C每 10⁴ 个细胞每分钟催化水解产生 1 μ mol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

AKP 活性 (U/10⁴ cell) = C 标准品 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \times 稀释倍数 \div (细胞数量 \times V1 \div V2) \div T = 625 \times (A 测定管-A 对照管) \div (A 标准管-A 空白管) \div 细胞数量

注： C 标准品：0.25 $\mu\text{mol/mL}$ 标准酪氨酸溶液；稀释倍数： $(100+200+200)\div 200=2.5$ ；V1：加入反应体系中粗酶液体积，100 $\mu\text{L}=0.1\text{ mL}$ ；V2：粗酶液总体积，1mL；T：催化反应时间，10min。

注意事项：

临用前配制的试剂配置好后 3 天内使用完毕。