

碱性蛋白酶(AKP)活性检测试剂盒说明书

Alkali Proteinase Assay Kit

微量法

货号: AK116

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK116-A	55ml ×1 瓶	4℃保存
AK116-B	粉剂×1 瓶	4℃保存
AK116-C	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
AK116-D	粉剂×1 瓶	4℃保存
AK116-E	4ml ×1 瓶	4℃保存
AK116-标准品(0.25umol/ml)	1ml ×1 支	4℃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/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪、1.5 mL EP 管、蒸馏水

试剂预配制:

AK116-B: 临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解备用

AK116-C: 临用前加入 5mL AK116-A 沸水浴中溶解

AK116-D: 临用前加入 20mL 蒸馏水充分溶解备用

粗酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g): AK116-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK116-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): AK116-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL AK116-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/酶标仪预热 30min, 调节波长到 680 nm, 蒸馏水调零。
2. AK116-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	20	20		
AK116-B	40			

AK116-C		40		
混匀后置于 40℃水浴保温 10min				
AK116-B		40		
AK116-C	40			
混匀后 10000rpm 4℃离心 10min, 取上清				
上清	40	40		
蒸馏水			40	
标准品				40
AK116-D	200	200	200	200
AK116-E	40	40	40	40
混匀后置于 40℃水浴保温 20min, 取 200μL 于微量玻璃比色皿/96 孔板, 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.空白管和标准管各只需要测定 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℃每毫克蛋白每分钟催化水解产生 1μmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

AKP 活性 (U/mg prot) = C 标准品 × (A 测定管-A 对照管) ÷ (A 标准管-A 空白管) × 稀释倍数 ÷ (Cpr × V1) ÷ T = 3.125 × (A 测定管-A 对照管) ÷ (A 标准管-A 空白管) ÷ Cpr

2. 按照样本质量计算

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

AKP 活性 (U/g) = C 标准品 × (A 测定管-A 对照管) ÷ (A 标准管-A 空白管) × 稀释倍数 ÷ (W × V1 ÷ V2) ÷ T = 3.125 × (A 测定管-A 对照管) ÷ (A 标准管-A 空白管) ÷ W

3. 按照液体体积计算

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

AKP 活性 (U/mL) = C 标准品 × (A 测定管-A 对照管) ÷ (A 标准管-A 空白管) × 稀释倍数 ÷ V1 ÷ T = 3.125 × (A 测定管-A 对照管) ÷ (A 标准管-A 空白管)

4. 按照细胞数量计算

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

AKP 活性 (U/10⁴ cell) = C 标准品 × (A 测定管-A 对照管) ÷ (A 标准管-A 空白管) × 稀释倍数 ÷ (细胞数量 × V1 ÷ V2) ÷ T = 3.125 × (A 测定管-A 对照管) ÷ (A 标准管-A 空白管) ÷ 细胞数量

注： C 标准品：0.25 μmol/mL 标准酪氨酸溶液；稀释倍数：(20+40+40) ÷ 40=2.5；W：样品质量 (g)；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体积 (mL)，20 μL=2 × 10⁻² mL；V2：粗酶液总体积 (mL)，1mL；T：催化反应时间 (min)，10min。

注意事项：

临用前配制的试剂配置好后 3 天内使用完毕。