

酸性蛋白酶(ACP)活性检测试剂盒

Acidic Proteinase Assay Kit

分光光度法

货号: AK154

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK154-A	35ml ×1 瓶	4°C保存
AK154-B	粉剂×1 瓶	4°C保存; 临用前加 10 ml 蒸馏水溶解, 3 天内有效;
AK154-C	粉剂×1 瓶	4°C避光保存; 临用前加入 10 mL AK154-A, 沸水浴溶解, 3 天内有效;
AK154-D	粉剂×1 瓶	4°C保存; 临用前加入 50 ml 蒸馏水溶解, 3 天内有效;
AK154-E	10ml×1 瓶	4°C保存
AK154-标准品	1ml×1 支(0.25umol/mL)	4°C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: 酸性蛋白酶 (Acidic Proteinase, ACP) 是一种在酸性环境下催化蛋白质水解的酶。该酶主要用于酒精发酵、啤酒酿造、毛皮软化、果酒澄清、酱油酿造、饲料等。

原理: 酸性条件下, ACP 催化酪蛋白水解产生酪氨酸; 在碱性条件下, 酪氨酸还原磷钼酸化合物生成钨蓝; 钨蓝在 680nm 有特征吸收峰, 通过测定其吸光度增加, 来计算 ACP 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、研钵/匀浆器、1mL 玻璃比色皿、EP 管和蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g): AK154-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK154-A) 冰浴匀浆, 8000g, 4°C 离心 10min, 取上清, 即粗酶液。
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): AK154-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL AK154-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°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

测定操作:

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长到 680 nm, 蒸馏水调零。
2. AK154-B、AK154-C 和 AK154-D 置于 30°C 水浴保温 30min。
3. 在 EP 管中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)
粗酶液	100	100		
AK154-B	200			
AK154-C		200		
混匀后置于 30°C 水浴保温 10min				
AK154-B		200		

AK154-C	200			
混匀后 8000g, 4℃离心 10min, 留取上清				
上清液 (离心后留存)	200	200		
蒸馏水			200	
标准品				200
AK154-D	1000	1000	1000	1000
AK154-E	200	200	200	200
混匀后置于 30℃水浴保温 20min, 取 1000μL 于玻璃比色皿中, 于 680nm 测定吸光值, 分别记为 A 对照管、A 测定管、A 空白管、A 标准管。				

注意: 1.测定管与空白管不同, 先加 AK154-C, 后加 AK154-B

2.空白管和标准管只需要测定 1-2 次。

计算公式:

1. 按照蛋白浓度计算

ACP 活性单位定义: 30℃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。

ACP 活性 (U/mg prot)

$$= C \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times \text{稀释倍数} \div (Cpr \times V1) \div T$$

$$= 0.625 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

2. 按照样本质量计算

ACP 活性单位定义: 30℃每克样品每分钟催化水解产生 1μmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

ACP 活性 (U/g)

$$= C \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times \text{稀释倍数} \div (W \times V1 \div V2) \div T$$

$$= 0.625 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

3. 按照液体体积计算

ACP 活性单位定义: 30℃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。

ACP 活性 (U/mL)

$$= C \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times \text{稀释倍数} \div V1 \div T$$

$$= 0.625 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

4. 按照细胞数量计算

ACP 活性单位定义: 30℃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。

ACP 活性 (U/10⁴ cell)

$$= C \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times \text{稀释倍数} \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V2) \div T$$

$$= 0.625 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

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