

# 中性蛋白酶（NP）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：BC2290

规格：50T/24S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 35mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 50mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前加入 10mL 蒸馏水，充分溶解。
- 2、试剂二：临用前加入 10mL 提取液，沸水浴中搅拌溶解。
- 3、标准品：20 $\mu$ mol/mL 标准酪氨酸。

## 产品说明：

NP 在一定的温度和中性 pH 条件下，催化水解蛋白质。由于其安全无毒、水解能力强、作用范围广等特点，中性蛋白酶常用于食品、饲料、化妆品和营养保健品生产。中性条件下，NP 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；在 680nm 有特征吸收峰。

**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

## 需自备的仪器和用品：

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

## 操作步骤：

### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

称约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，冰上充分研磨，10000rpm 4℃离心 10min，取上清，即粗酶液，置冰上待测。或直接称取 0.1g 酶制品，加入 1mL 提取液，置冰上待测。

### 二、测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 680nm，蒸馏水调零。
- 2、试剂一、试剂二和试剂三置于 30℃ 水浴保温 30min 以上。
- 3、标准溶液的配制：临用前将 20 $\mu$ mol/mL 标准液用蒸馏水稀释 80 倍至 0.25 $\mu$ mol/mL 标准溶液使用，现用现配。
- 4、样本测定（1.5mL EP 管中分别加入下列试剂）：

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	空白管	标准管
粗酶液	100	100		
试剂一	200			
试剂二		200		
混匀后30°C水浴保温10min				
试剂一		200		
试剂二	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
试剂三	1000	1000	1000	1000
试剂四	200	200	200	200
混匀后30°C水浴保温20min, 取1mL于1mL玻璃比色皿中, 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。				

### 三、NP活性计算

#### (1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义: 30°C每毫克蛋白每分钟水解产生 1μmol 酪氨酸为一个酶活单位。

$$\text{NP 活性 (U/mg prot)} = C \text{ 标准品} \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times V1 \div (Cpr \times V2) \div T = 0.125 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div Cpr$$

#### (2) 按样本质量计算

单位定义: 30°C每克样本每分钟催化水解产生 1 μmol 酪氨酸为一个酶活单位。

$$\text{NP 活性 (U/g 质量)} = C \text{ 标准品} \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times V1 \div (W \times V2 \div V3) \div T = 0.125 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W$$

C 标准品: 0.25 μmol/mL 标准酪氨酸溶液; Cpr: 粗酶液蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; V1: 酶促反应总体积, 0.5mL; V2: 加入反应体系中粗酶液体积, 0.1mL; V3 粗酶液总体积, 1mL; T: 催化反应时间, 10min。

#### 注意事项:

若反应较弱, (A 测定管-A 对照管) 差值较小, 可适当延长反应时间 (20-30min), 即第一步水浴时间, 最后计算酶活时对公式进行修改。

#### 实验实例:

1、取 0.1g 兔脾脏加入 1mL 提取液冰上充分研磨, 10000rpm 4°C离心 10min, 取上清, 即粗酶液, 置冰上, 之后按照测定步骤操作, 测得计算  $\Delta A \text{ 测定} = A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管} = 0.195 - 0.175 = 0.02$ ,  $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管} = 0.408 - 0 = 0.408$ 。按样本质量计算酶活得:

$$\text{NP 活性 (U/g 质量)} = 0.125 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 0.125 \times 0.02 \div 0.408 \div 0.1 = 0.0613 \text{ U/g 质量。}$$

#### 相关系列产品:

BC2280/BC2285 酸性蛋白酶 (ACP) 活性检测试剂盒

BC2300/BC2305 碱性蛋白酶 (AKP) 活性检测试剂盒



