

碱性蛋白酶（AKP）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：BC2300

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：20μmol/mL 标准酪氨酸。

产品说明：

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。

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。

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

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40℃水浴保温30min以上。
- 3、标准溶液的配制：临用前将20μmol/mL标准液用蒸馏水稀释80倍至0.25μmol/mL 标准溶液使用，现用现配。
- 4、样本测定：(1.5mLEP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40℃水浴保温10min				
试剂一	-	200		
试剂二	200	-		
混匀后10000rpm 4℃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40℃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 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ 、 $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。

三、碱性蛋白酶活性计算

1、按蛋白浓度计算

酶活单位定义: 40℃每毫克蛋白每分钟催化水解产生 1 μmol 酪氨酸为一个酶活单位。

AKP 活性 (U/mg prot) = $C_{标准品} \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times V_1 \div (C_{pr} \times V_2) \div T = 0.125 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div C_{pr}$

2、按样本质量计算

酶活单位定义: 40℃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。

AKP 活性 (U/g 质量) = $C_{标准品} \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times V_1 \div (W \times V_2 \div V_3) \div T = 0.125 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W$

C 标准品: 0.25 μmol/mL 标准酪氨酸溶液; C_{pr}: 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, 0.1 mL; 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。

相关发表文献:

[1] Wang Y, Pu M, Yan J, Zhang J, Wei H, Yu L, Yan X, He Z. 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'- tetraacetic Acid Acetoxymethyl Ester Loaded Reactive Oxygen Species Responsive Hyaluronic Acid-Bilirubin Nanoparticles for Acute Kidney Injury Therapy via Alleviating Calcium Overload Mediated Endoplasmic Reticulum Stress. ACS Nano. 2023 Jan 10;17(1):472-491. doi: 10.1021/acsnano.2c08982. Epub 2022 Dec 27. PMID: 36574627.

[2] Yan R, Guo Y, Wang X, Liang G, Yang A, Li J. Near-Infrared Light-Controlled and Real-Time Detection of Osteogenic Differentiation in Mesenchymal Stem Cells by Upconversion Nanoparticles for Osteoporosis Therapy. ACS Nano. 2022 May 24;16(5):8399-8418. doi: 10.1021/acsnano.2c02900. Epub 2022 May 15. PMID: 35574921.





[3] Li Z, Wang H, Zhang K, Yang B, Xie X, Yang Z, Kong L, Shi P, Zhang Y, Ho YP, Zhang ZY, Li G, Bian L. Bisphosphonate-based hydrogel mediates biomimetic negative feedback regulation of osteoclastic activity to promote bone regeneration. *Bioact Mater*. 2021 Nov 12; 13:9-22. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.11.004. PMID: 35224288.

[4] Xu Q, Song X, Xu M, Xu Q, Liu Q, Tang C, Wang X, Yin W, Wang X. Elevated CO₂ and biochar differentially affect plant C: N: P stoichiometry and soil microbiota in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Chemosphere*. 2022 Dec;308(Pt 2):136347. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.136347. Epub 2022 Sep 7. PMID: 36087720.

[5] Li W, Li S, Zhang J, Zhong H, Liang J, Huang S, Liao G, Zhang B, Liu C. Fabrication and evaluation of bone morphogenetic protein-2 microspheres coated black phosphorus nanosheets@polylactic-glycolic acid copolymers scaffold: A multifunctional antibacterial photothermal scaffold for bone regeneration. *Int J Biol Macromol*. 2022 Jun 15; 210:350-364. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.05.028. Epub 2022 May 10. PMID: 35537585.

相关系列产品:

BC2280/BC2285 酸性蛋白酶 (ACP) 活性检测试剂盒

BC2290/BC2295 中性蛋白酶 (NP) 活性检测试剂盒

