

碱性蛋白酶（AKP）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC2305

规格：100T/48S

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 55mL×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 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 4mL×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 4mL 蒸馏水，充分溶解；2-8℃保存 8 周。
- 2、试剂二：临用前取 1 瓶加入 4mL 提取液，沸水浴中搅拌溶解；2-8℃保存 8 周。
- 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/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/酶标仪预热 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	20	20	-	-
试剂一	40	-		
试剂二	-	40		
混匀后40℃水浴保温10min				
试剂一	-	40		
试剂二	40	-		
混匀后10000rpm 4℃离心10min，取上清				
上清	40	40	-	-
蒸馏水	-	-	40	-
标准品	-	-	-	40
试剂三	200	200	200	200
试剂四	40	40	40	40
混匀后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 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ 、 $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。空白管和标准管只需做1-2次

三、碱性蛋白酶活性计算

1、按样本蛋白浓度计算

酶活单位定义: 40°C每毫克蛋白每分钟催化水解产生 1μmol 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°C每克样本每分钟催化水解产生 1μmol 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: 标准酪氨酸溶液浓度, 0.25μmol/mL; 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, 0.1mL; V₂: 加入反应体系中粗酶液体积, 20μL=2×10⁻²mL; 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] Shu M, Lu P, Liu S, Zhang S, Gong Z, Cai X, Zhou B, Lin Q, Liu J. Disruption of the Chitin Biosynthetic Pathway Results in Significant Changes in the Cell Growth Phenotypes and Biosynthesis of Secondary Metabolites of *Monascus purpureus*. J Fungi (Basel). 2022 Aug 27;8(9):910. doi: 10.3390/jof8090910. PMID: 36135635; PMCID: PMC9503372.

[2] Zhao L, Wang J, Zhang H, Wang P, Wang C, Zhou Y, Li H, Yu S, Wu R. Inhibitory effect of carvacrol against *Alternaria alternata* causing goji fruit rot by disrupting the integrity and composition of cell wall. Front Microbiol. 2023 Feb 20; 14:1139749. doi: 10.3389/fmicb.2023.1139749. PMID: 36891390; PMCID: PMC9986456.



[3] Yao Z, Chen L, Hu M, Meng F, Chen M, Wang G. The discovery of a new potent FXR agonist based on natural product screening. *Bioorg Chem.* 2024 Feb; 143:106979. doi: 10.1016/j.bioorg.2023.106979. Epub 2023 Nov 19. PMID: 37995646.

[4] Zhang Q, Kong G, Zhao G, Liu J, Jin H, Li Z, Zhang G, Liu T. Microbial and enzymatic changes in cigar tobacco leaves during air-curing and fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2023 Sep;107(18):5789-5801. doi: 10.1007/s00253-023-12663-5. Epub 2023 Jul 17. PMID: 37458766; PMCID: PMC10439857.

[5] Guan T, Feng J, Zhu Q, Wang L, Xie P, Wang H, Li J. Effects of abamectin on nonspecific immunity, antioxidation, and apoptosis in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Fish Shellfish Immunol.* 2023 Nov; 142:109137. doi: 10.1016/j.fsi.2023.109137. Epub 2023 Oct 11. PMID: 37827246.

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

