

碱性蛋白酶（Alkaline protease, AKPT）试剂盒说明书

（分光法 24 样）

一、产品简介：

蛋白酶广泛存在于动物内脏、植物茎叶、果实和微生物中，碱性蛋白酶（AKPT）是在碱性条件下将酪蛋白水解产生酪氨酸；酪氨酸与福林酚在碱性条件下反应生成蓝色化合物；该蓝色物质在 680nm 有特征吸收峰，进而得碱性蛋白酶活性，

由于底物酪蛋白自身含有多种氨基酸，所以在检测过程中必须设置带有底物酪蛋白的对照，以扣除有干扰的背景值，排除假阳性。

二、测试盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×2 瓶	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，每瓶加入 3mL 试剂二 90℃加热搅拌至分散，再加 12mL 提取液搅拌至溶解，最后再加提取液定容至 30mL,继续搅拌至全部溶解；配置完的试剂 4℃保存，三天内用完。
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	用前摇匀
试剂三	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	用前摇匀
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	用前摇匀
试剂五	液体 5mL×1 棕色瓶	4℃保存	现用现配，用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，临用前加 10mL 蒸馏水，4℃保存，一星期内用完。
标准品	粉体 mg×1 支 EP	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

【注】：试剂一若在磁力搅拌器（带温控）上溶解，可用锡箔纸或保鲜膜盖住烧杯，以免溶解过程中水分蒸发过快。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪。

四、碱性蛋白酶（AKPT）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

- ① 组织样本：测定管和对照管分别取约 0.1g 组织（水分充足的果实约 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆；12000rpm，4℃离心 15min；取上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取

- ② 细菌/真菌样本：测定管和对照管分别取约 500 万细胞加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；12000rpm，4℃离心 15min；取上清液待测。

【注】：若增加样本量，按细菌或细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 比例进行提取

- ③ 液体样本：澄清液体直接检测；若浑浊则 12000rpm，4℃离心 15min；上清待测。

2、上机检测：

- ① 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 680nm，蒸馏水调零。
- ② 配制好的试剂一需预先 50℃水浴 10min，在 2mL 离心管中依次加入下列试剂培养：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	500	500
试剂一	500	

40℃振荡培养 10min, 同时, 余下的试剂一须单独 40℃振荡培养 10min		
上步单独 40℃培养的试剂一		500
试剂三	500	500
混匀, 室温静置 10min, 1500rpm (须准确), 4℃离心 10min, 上清液待用		

③ 显色反应: 在 EP 管中依次加入:

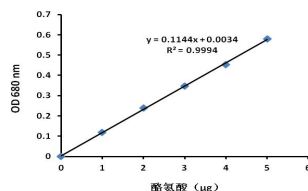
上清液	250	250
试剂四	375	375
试剂五	250	250
40℃水浴 20min, 取全部澄清液 (若浑浊, 可 1500rpm 离心 10min) 转移至 1mL 玻璃比色皿中, 于 680nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$		

【注】1. 若 ΔA 在零附近徘徊, 可以加大样本量 (如增加到 0.2g), 或延长 40℃培养时间 (如增加至 30min), 或在显色反应阶段加大上清液体积 (如, 增加至 350 μ L, 则试剂五相应减少), 则改变后的样本质量 W, 反应时间 T 和显色步骤中的上清液体积 V1 需代入公式重新计算。

2. 若测定管的 A 值大于 1.5, 可减少样本取样量 (如减少到 0.05g), 或把上清液用蒸馏水进行稀释, 稀释倍数 D 代入公式参与计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.1144x + 0.0034$, x 是标准品质量 (μ g), y 是 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算:

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

$$\text{AKPT 活性}(\mu\text{g/min/mg prot}) = (\Delta A - 0.0034) \div 0.1144 \times (V3 \div V2) \div (Cpr \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 10.5 \times (\Delta A - 0.0034) \div Cpr \times D$$

3、按照样本质量计算:

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

$$\text{AKPT 活性}(\mu\text{g/min/g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0034) \div 0.1144 \times (V3 \div V2) \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 10.5 \times (\Delta A - 0.0034) \div W \times D$$

4、按照细胞数量计算:

单位定义: 40℃每 10^4 个细胞每分钟催化水解产生 1 μ g 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{AKPT 活性}(\mu\text{g/min}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A - 0.0034) \div 0.1144 \times (V3 \div V2) \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 10.5 \times (\Delta A - 0.0034) \div \text{细胞数量} \times D$$

5、按液体体积计算:

活性单位定义: 40℃每毫升液体样本每分钟催化水解产生 1 μ g 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{AKPT 活性}(\mu\text{g/min/mL}) = (\Delta A - 0.0034) \div 0.1144 \times (V3 \div V2) \div V4 \div T \times D = 10.5 \times (\Delta A - 0.0034) \times D$$

V---提取液体积, 1mL; V1---样本体积, 0.5mL; V2---显色步骤上清液体积, 0.25mL;

V3---培养步骤总反应体积, 1.5mL; V4---液体样本, 0.5mL; 酪氨酸分子量---181.19;

T---反应时间, 10min;

W---样本质量, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr---粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒检测。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 标准品母液 (100 μ g/mL): 标准品溶于 100mL 的 0.1mol/L 盐酸溶液中 (两天内用完且-20℃保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度标准品: 0, 4, 8, 12, 16, 20. μ g/mL。也可根据实际来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的显色反应阶段加样表依次加样, 根据结果即可制作标准曲线。