碱性蛋白酶（AKPT）活性检测试剂盒说明书

规格：24 样　　方法：酶标仪法

一、注意事项

1. 使用前请通读一遍说明书再开始实验。
2. 正式检测前选取 2~3 个样本进行预检测。
3. 本试剂盒仅用于科研。
4. 临用前配制的试剂配置好后 3 天内使用完毕。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
试剂一	33 mL×1	4℃	
试剂二	粉剂×1	4℃	临用前加 2.5 mL 蒸馏水溶解。
试剂三	粉剂×1	4℃避光	临用前加入 2.5 mL 试剂一，沸水浴中磁力搅拌溶解。（可在烧杯上盖一层保鲜膜，注意观察，避免水分全部蒸发，一般加热 15~30 分钟，该试剂为过饱和试剂，充分混匀后仍出现颗粒物不溶物不影响使用）
试剂四	粉剂×1	4℃	临用前加 12 mL 蒸馏水溶解。
试剂五	2.5 mL×1	4℃	
标准品	1 mL×1	4℃	0.25 μmol/mL 标准酪氨酸溶液，

三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水、研磨仪/研钵、冰、水浴锅。

四、样品制备

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一）进行冰浴匀浆，然后，10000 g，4℃，离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本。

2. 细菌/细胞：按照细菌/细胞数量（10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300 w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3 min）；然后 10000 g，4℃，离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本。

3. 液体样本：澄清的液体的样本直接测定，若浑浊则离心后取上清液检测。

五、测定步骤

1. 酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 680 nm 处。

2. 试剂二、试剂三和试剂四置于 40℃水浴保温 30 min。

3. 在 1.5 mL 离心管中依次加入：

	测定管	对照管	空白管	标准管
样本（μL）	20	20	-	-
试剂二（μL）	-	40	-	-
试剂三（μL）	40	-		
混匀后置于 40℃水浴保温 10 min。				
试剂二（μL）	40	-		
试剂三（μL）	-	40		
混匀后 8000 g，4℃离心 10 min；在新的离心管中加入下列上清及试剂。				
上清（μL）	40	40	-	-
标准溶液（μL）	-	-	-	40
蒸馏水/超纯水（μL）	-	-	40	-
试剂四（μL）	200	200	200	200
试剂五（μL）	40	40	40	40
充分混匀后置于 40℃水浴保温 20 min，吸取 200 μL 于 96 孔板中，于 680 nm 测定吸光度值，记 A 测定、A 对照、A 空白、A 标准，ΔA=（A 测定-A 对照）÷（A 标准-A 空白），每个测定管设置一个对照管，空白管和标准管只需要测定 2~3 次。				

六、计算

1. 按照液体样本体积计算：

单位定义：40℃每毫升样品每分钟催化水解产生 1 nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

碱性蛋白酶（AKP）活性（nmol/min/mL）=C 标准×10^3×ΔA×V 反总÷V1÷T=125×ΔA

2. 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 nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

碱性蛋白酶（AKP）活性（nmol/min/g 鲜重）=C 标准×10^3×ΔA×V 反总÷（W×V1÷V2）÷T=125×ΔA÷W

3. 按照蛋白质浓度计算（需另测蛋白浓度）：

单位定义：40℃每毫克蛋白每分钟水解产生 1 nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

碱性蛋白酶（AKP）活性（nmol/min/mg prot）=C 标准×10^3×ΔA×V 反总÷（Cpr×V1）÷T=125×ΔA÷Cpr

4. 按细菌/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 nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

碱性蛋白酶（AKP）活性（nmol/min/10^4 cell）=C 标准×10^3×ΔA×V 反总÷（N×V1÷V2）÷T=125×ΔA÷N

C 标准：0.25 μmol/mL 标准酪氨酸溶液；10^3：μmol=10^3 nmol；V 反总：酶促反应总体积，0.1 mL；Cpr：粗酶液蛋白质浓度（mg/mL）；V1：加入反应体系中粗酶液体积（mL），0.02 mL；V2：提取液总体积（mL），1 mL；T：催化反应时间（min），10 min；W：样品质量（g）；N：细菌/细胞数量，万个。

七、产品简介

碱性蛋白酶是植物和微生物体内一类在碱性条件下表现高活性的丝氨酸蛋白酶。主要功能是催化蛋白质及多肽链内部肽键的水解断裂，降解储藏蛋白、老化和损伤蛋白及胞外基质蛋白，释放游离氨基酸和活性肽供植物代谢再利用，是评价生物蛋白质降解代谢活性、氮素再利用效率及抗逆性程度的重要酶学指标。