中性蛋白酶（NPT）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制好后 4℃保存，并且 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，8000 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 200 w，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次）；然后 8000 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 30℃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 30℃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 30℃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：30℃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。

中性蛋白酶（NPT）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：30℃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。

中性蛋白酶（NPT）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：30℃每毫克蛋白每分钟水解产生 1 nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

中性蛋白酶（NPT）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：30℃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。

中性蛋白酶（NPT）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

中性蛋白酶是植物和微生物体内一类在中性 pH 条件下表现最佳活性的内肽酶。主要功能是催化蛋白质及多肽内部肽键的水解断裂，降解细胞内短寿命调节蛋白、老化和损伤蛋白以及胞外基质蛋白，是评价生物蛋白质代谢周转活性、发育调控能力及胁迫响应程度的重要酶学指标。