

碱性蛋白酶（Alkaline protease, AKP）活性测定试剂盒说明书**微量法 100T/48S**

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。

测定原理：

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。

自备仪器和用品：

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、0.5 mL EP 管和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 5mL 蒸馏水溶解。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加入 10mL 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 瓶，4℃ 保存。临用前加 20mL 蒸馏水溶解。

试剂五：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存。

标准品：液体 1mL×1 支，0.25μmol/mL 标准酪氨酸溶液，4℃ 保存。

粗酶液提取：

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 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）冰浴匀浆，8000g，4℃ 离心 10min，取上清，即粗酶液。
2. 血清或培养液：直接测定。
3. 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴ 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长到 680 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二、试剂三和试剂四置于 40℃ 水浴保温 30min。
3. **对照管**：取 0.5 mL EP 管，加入 20 μL 粗酶液，40 μL 试剂二，混匀后置于 40℃ 水浴保温 10min；加入 40μL 试剂三，混匀后 8000g，4℃ 离心 10min；取 40μL 上清液，加入新的 EP 管，再加入 200μL 试剂四，40μL 试剂五，混匀后置于 40℃ 水浴保温 20min，吸取 200μL 于 680nm 测定光吸收，记为 A 对照管。
4. **测定管**：取 0.5 mL EP 管，加入 20μL 粗酶液，40μL 试剂三，混匀后置于 40℃ 水浴保温 10min；加入 40μL 试剂二，混匀后 8000g，4℃ 离心 10min；取 40μL 上清液，加入新的 EP 管，再加入 200μL 试剂四，40μL 试剂五，混匀后置于 40℃ 水浴保温 20min，吸取 200μL 于 680nm 测定光吸收，记为 A 测定管。（**注意与空白管不同，先加试剂三，后加试剂二**）
5. **空白管**：取 0.5 mL EP 管，加入 40μL 蒸馏水，200μL 试剂四，40μL 试剂五，混匀后置于 40℃ 水浴保温

20min, 吸取 200 μ L 于 680nm 测定光吸收, 记为 A 空白管。

6. **标准管:** 取 0.5 mL EP 管, 加入 40 μ L 标准品, 200 μ L 试剂四, 40 μ L 试剂五, 混匀后置于 40 $^{\circ}$ C 水浴保温 20min, 吸取 200 μ L 于 680nm 测定光吸收, 记为 A 标准管。

注意: 空白管和标准管只需要测定一次。

计算公式:

1. 按照样本蛋白浓度计算

AKP 活性单位定义: 30 $^{\circ}$ C 每毫克蛋白每分钟水解产生 1nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

AKP 活性 (nmol/min /mg prot) = C 标准品 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \times V 反总 \div (Cpr \times V1) \div T = 125 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \div Cpr

2. 按照样本质量计算

AKP 活性单位定义: 30 $^{\circ}$ C 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。

AKP 活性 (nmol/min /g 鲜重) = C 标准品 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \times V 反总 \div (W \times V1 \div V2) \div T = 125 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \div W

3. 按照液体体积计算

AKP 活性单位定义: 30 $^{\circ}$ C 每毫升样品每分钟催化水解产生 1nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

AKP 活性 (nmol/min/mL) = C 标准品 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \times V 反总 \div V1 \div T = 125 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管)

4.

5. 按照细胞数量计算

AKP 活性单位定义: 30 $^{\circ}$ C 每 10⁴ 个细胞每分钟催化水解产生 1nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

AKP 活性 (nmol/min /10⁴ cell) = C 标准品 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \times V 反总 \div (细胞数量 \times V1 \div V2) \div T = 125 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \div 细胞数量

C 标准品: 0.25 μ mol/mL 标准酪氨酸溶液; V 反总: 酶促反应总体积, 0.1mL; 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), 1mL; T: 催化反应时间 (min), 10min; W: 样品质量 (g)。

注意事项:

临用前配制的试剂配置好后 3 天内使用完毕。