

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0400

Size: 100T/48S

酸性蛋白酶（ACP）检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义：

ACP 是一种在酸性环境下催化蛋白质水解的酶。该酶主要用于酒精发酵、啤酒酿造、毛皮软化、果酒澄清、酱油酿造、饲料等。

二、测定原理：

酸性条件下，ACP 催化酪蛋白水解产生酪氨酸；在碱性条件下，酪氨酸还原磷钨酸化合物生成钨蓝；钨蓝在 680nm 有特征吸收峰，通过测定其吸光度增加，来计算 ACP 活性。

三、需自备的仪器和用品：

研钵、台式离心机、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、1.5mLEP 管和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 55mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂一	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加 4mL 蒸馏水溶解
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃避光保存	临用前加入 4mL 提取液，沸水浴中磁力搅拌溶解。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂四	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	—
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	0.25 μmol/mL 标准酪氨酸溶液

五、操作步骤：

● 粗酶液提取：

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。

● 测定：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 680 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂一、试剂二和试剂三置于 30℃水浴保温 30min 以上。
3. 样本测定（在1.5mLEP 管中依次加入下列试剂）

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 30℃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 30℃水浴保温 20min				

取 200 μ L 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。

六、ACP 活性计算:

1. 按蛋白浓度计算

ACP 活性单位 (U) 定义: 30℃每毫克蛋白每分钟催化水解产生 1 μ mol 酪氨酸。

酸性蛋白酶活性 (U/mg prot) = $C_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_1 \div (C_{\text{pr}} \times V_2) \div T = 0.125 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$

2. 按样本鲜重计算

AP 活性单位 (U) 定义: 30℃每克样品每分钟催化水解产生 1 μ mol 酪氨酸。

AP 活性 (U/g) = $C_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_1 \div (W \times V_2 \div V_3) \div T = 0.125 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W$

C 标准品: 0.25 μ mol/mL 标准酪氨酸溶液; C_{pr} : 粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL); W: 样品质量 (g); V_1 : 酶促反应总体积 (mL) 0.1mL; V_2 : 加入反应体系中粗酶液体积 (mL) 2×10^{-2} mL; V_3 : 粗酶液总体积 (mL) 1mL; T: 催化反应时间 (min) 10min。

注意: 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。