

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-S0401

Size: 100T/48S

中性蛋白酶 (NP) 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:

NP 在一定的温度和中性 pH 条件下, 催化水解蛋白质。由于其安全无毒、水解能力强、作用范围广等特点, 中性蛋白酶常用于食品、饲料、化妆品和营养保健品生产。

二、测定原理:

中性条件下, NP 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; 在 680nm 有特征吸收峰。

三、需自备的仪器和用品:

研钵、台式离心机、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、1.5 mL EP 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 μL 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，并计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 、 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

六、NP 酶活性计算：

(1) 按蛋白浓度计算

NP 活性单位 (U) 定义：30°C 每毫克蛋白每分钟水解产生 1 μmol 酪氨酸为一个酶活单位。

NP 活性 (U/mg prot) = $C_{\text{标准品}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_1 \div (C_{\text{pr}} \times V_2) \div T$

= $0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本鲜重计算

NP 活性单位 (U) 定义：30°C 每克样品每分钟催化水解产生 1 μmol 酪氨酸为一个酶活单位。

NP 活性 (U/g 鲜重) = $C_{\text{标准品}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_1 \div (W \times V_2 \div V_3) \div T$

= $0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$

C 标准品：标准酪氨酸溶液浓度，0.25 $\mu\text{mol/mL}$ ；C_{pr}：粗酶液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品鲜重，g；V₁：酶促反应总体积，0.1mL；V₂：加入反应体系中粗酶液体积，20 μL = 2×10^{-2} mL；V₃：粗酶液总体积，1mL；T：催化反应时间，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，最后计算酶活时公式