

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-S0678

Size: 50T/24S

碱性蛋白酶检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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：

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。

二、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，酪氨酸还原磷钨酸生成钨蓝；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。

三、需自备的仪器和用品：

研钵、台式离心机、可见分光光度计、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪、1.5 mL EP 管、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

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 35mL × 1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 × 1 瓶	4℃保存	临用前 10mL 蒸馏水溶解
试剂二	粉剂 × 1 瓶	4℃避光保存	临用前加入 10mL 提取液，沸水浴中磁力搅拌溶解
试剂三	液体 50mL × 1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 10mL × 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：

1. 粗酶液提取：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，冰上充分研磨，10000rpm 4℃离心 10min，取上清液，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。

2. 测定：

(1) 分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 680nm，蒸馏水调零。

(2) 试剂一、试剂二和试剂三置于 40℃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	100	100		
试剂一	200			
试剂二		200		
混匀后 40℃水浴保温 10min				
试剂一		200		
试剂二	200			
混匀后 10000rpm 4℃离心 10min，取上清				
上清	200	200		
蒸馏水			200	
标准品				200
试剂三	1000	1000	1000	1000
试剂四	200	200	200	200
混匀后 40℃水浴保温 20min				

取1mL 于1mL 玻璃比色皿中，在 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、碱性蛋白酶活性计算：

(1) 按蛋白浓度计算

AKP 活性单位 (U) 定义：40℃每毫克蛋白每分钟催化水解产生 1 μmol 酪氨酸为一个酶活单位。

AKP 活性 (U/mg prot) = C 标准品 × (A 测定管 - A 对照管) ÷ (A 标准管 - A 空白管) × V1 ÷ (Cpr × V2) ÷ T = 0.125 × (A 测定管 - A 对照管) ÷ (A 标准管 - A 空白管) ÷ Cpr

(2) 按样本鲜重计算

AKP 活性单位 (U) 定义: 40°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。

AKP 活性 (U/g 鲜重) = $C \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V1 \div (W \times V2 \div V3)$

$\div T = 0.125 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$

C 标准品: 0.25 $\mu\text{mol/mL}$ 标准酪氨酸溶液; Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL); W: 样品质量 (g); V1: 酶促反应总体积 (mL), 0.5mL; V2: 加入反应体系中粗酶液体积 (mL), 0.1 mL; V3: 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。