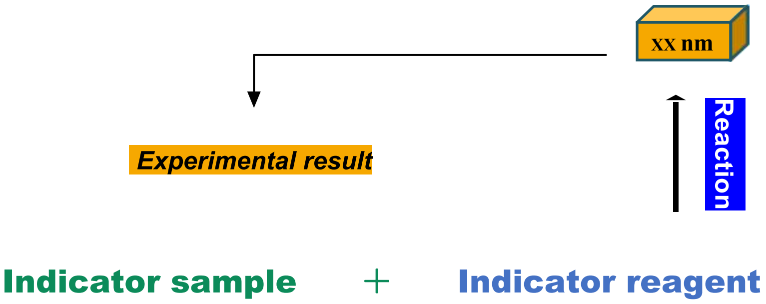
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

碱性蛋白酶（AKP）活性检测试剂盒说明书
微量法

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

产品内容：

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	0.25μmol/mL 标准酪氨酸溶液

产品说明：

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。

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。

试验所需自备仪器和用品：

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。

操作步骤：

一、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。

二、测定：

1.分光光度计或酶标仪预热 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 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	20	20		
试剂一	40			
试剂二		40		
混匀后 40℃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 40℃水浴保温 20min				

取 200μL 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。

三、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 1μmol 酪氨酸为一个酶活单位。

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

（2）按样本鲜重计算

AKP 活性单位（U）定义：40℃每克样品每分钟催化水解产生 1μmol 酪氨酸为一个酶活单位。

AKP 活性（U/g）=C 标准品×（A 测定－A 对照）÷（A 标准－A 空白）×V1÷（W×V2÷V3）÷T=0.125×（A 测定－A 对照）÷（A 标准－A 空白）÷W

C 标准品：0.25μmol/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)，0.1mL； V2：加入反应体系中粗酶液体积（mL)，2×10^{-2} 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。