400-901-9800
sales@bioss.com.cn
support@bioss.com.cn
www.bioss.com.cn

碱性蛋白酶(AKP)活性检测试剂盒说明书

Alkali Proteinase Assay Kit

微量法

货号：AK116

规格：100T/48S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK116-A	液体×1 瓶	4℃保存
AK116-B	粉剂×1 瓶	4℃保存
AK116-C	粉剂×1 瓶	4˚C避光保存
AK116-D	粉剂 x1 瓶	4˚C保存
AK116-E	液体 x1 瓶	4˚C保存
AK116-标准品	液体 x1 支	4˚C保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：碱性蛋白酶 (Alkali Proteinase, 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。

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。

自备用品：

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。

试剂预配制：

AK116-B：临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解备用

AK116-C：临用前加入 5mL AK115-A 沸水浴中溶解

AK116-D：临用前加入 20mL 蒸馏水充分溶解备用

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：AK116-A 体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL AK116-A）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）：AK116-A 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL AK116-A），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。

检测步骤：

1. 分光光度计预热 30min，调节波长到 680 nm，蒸馏水调零。
2. AK115-B、C、D 置于 40℃水浴中保温 30min。

1. 按顺序加入下列试剂：

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)	空白管 (ul)	标准管 (ul)
样本	20	20		
蒸馏水			40	
标准品				40

AK115-B	40	40		
混匀后置于 40℃水浴保温 10min				
AK115-C	40	40		
混匀后 8000g ，4℃离心 10min；取 40μL 上清液，加入新的 EP 管				
AK115-D	200	200	200	200
AK115-E	40	40	40	40
混匀后置于 40℃水浴保温 20min，于 680nm 测定光吸收				

注意：1.测定管与对照管加样顺序不同，先加试剂 C，后加试剂 B

2.空白管和标准管只需要测定一次。

计算公式：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照样本蛋白浓度计算

AKP 活性单位定义：40℃每毫克蛋白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/mg prot) = C 标准品×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)×稀释倍数÷(Cpr×V1)÷T= 3125×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)÷Cpr

2. 按照样本质量计算

AKP 活性单位定义：40℃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) = C 标准品×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)× 稀释倍数÷(W×V1÷V2)÷T= 3125×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)÷W

3. 按照液体体积计算

AKP 活性单位定义：40℃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×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)×稀释倍数÷V1÷T= 3125×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)

4. 按照细胞数量计算

AKP 活性单位定义：40℃每 10^4 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/10^4 cell) = C 标准品×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)× 稀释倍数÷(细胞数量×V1÷V2)÷T= 3125×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)÷细胞数量

注： C 标准品：0.25μmol/mL 标准酪氨酸溶液；稀释倍数：(20+40+40)÷40=2.5；W：样品质量（g）；Cpr：粗酶液蛋白质浓度（mg/mL），注意该粗酶液不能直接用于蛋白质含量测定，需要另外测定；建议称取同样质量的样品，加入 1mL 蒸馏水匀浆提取离心后，用本公司蛋白质含量测定试剂盒测定；V1：加入反应体系中粗酶液体积（mL），20μL=2×10^{-2} mL；V2：粗酶液总体积（mL），1mL；T：催化反应时间（min），10min。

b. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照样本蛋白浓度计算

AKP 活性单位定义：40℃每毫克蛋白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/mg prot) = C 标准品×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)×稀释倍数÷(Cpr×V1)÷T= 3125×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)÷Cpr

2. 按照样本质量计算

AKP 活性单位定义：40℃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) = C 标准品×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)× 稀释倍数÷(W×V1÷V2)÷T= 3125×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)÷W

3. 按照液体体积计算

AKP 活性单位定义：40℃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×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)×稀释倍数÷V1÷T= 3125×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)

4. 按照细胞数量计算

AKP 活性单位定义：40℃每 10^4 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/10^4 cell）= C 标准品×(A 测定管-A 对照管)÷(A 标准管-A 空白管)

注： C 标准品：0.25μmol/mL 标准酪氨酸溶液；稀释倍数：（20+40+40）÷40=2.5；W：样品质量（g）；Cpr：粗酶液蛋白质浓度（mg/mL），注意该粗酶液不能直接用于蛋白质含量测定，需要另外测定；建议称取同样质量的样品，加入 1mL 蒸馏水匀浆提取离心后，用本公司蛋白质含量测定试剂盒测定；V1：加入反应体系中粗酶液体积（mL），20μL=2×10^{-2} mL；V2：粗酶液总体积（mL），1mL；T：催化反应时间（min），10min。

注意事项：

临用前配制的试剂配置好后 3 天内使用完毕。