

酸性蛋白酶(ACP)活性检测试剂盒

Acidic Proteinase Assay Kit

微量法

货号: AK155

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK155-A	60ml×1 瓶	4℃保存
AK155-B	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加 4mL 蒸馏水溶解, 3 天内有效;
AK155-C	粉剂×1 瓶	4℃避光保存; 临用前加入 4 mL AK155-A, 沸水浴中磁力搅拌溶解, 3 天内有效;
AK155-D	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 20 mL 蒸馏水溶解, 3 天内有效;
AK155-E	4ml×1 瓶	4℃保存
AK155-标准品	1ml×1 支(0.25umol/mL)	4℃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: 酸性蛋白酶 (Acidic Proteinase, 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。

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, 酪氨酸还原磷钼酸化合物生成钨蓝; 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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪、微量玻璃比色皿/96 孔板、蒸馏水等

粗酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g): AK155-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK155-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): AK155-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL AK155-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。

测定操作:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 680 nm, 蒸馏水调零。
2. AK155-B、AK155-C 和 AK155-D 置于 30℃水浴保温 30min。
3. 在 EP 管中按顺序加入下列试剂:

试剂名称	对照管	测定管	空白管	标准管
粗酶液	20ul	20ul		
AK155-B	40ul			
AK155-C		40ul		
混匀后置于 30℃水浴保温 10min				

AK155-B		40ul		
AK155-C	40ul			
混匀后 8000g, 4℃离心 10min, 取上清				
上清液 (离心后获取)	40ul	40ul		
蒸馏水			40ul	
标准品				40ul
AK155-D	200ul	200ul	200ul	200ul
AK155-E	40ul	40ul	40ul	40ul
混匀后置于 30℃水浴保温 20min, 取 200μL 于微量玻璃比色皿/96 孔板中, 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。				

注意: 1.测定管与对照管不同, 先加 AK155-C, 后加 AK155-B

2.空白管和标准管只需要测定 1-2 次。

计算公式:

1. 按照蛋白浓度计算

ACP 活性单位定义: 30℃每毫克蛋白每分钟催化水解产生 1μmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{ACP 活性 (U/mg prot)} = C \text{ 标准品} \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times \text{稀释倍数} \div (\text{Cpr} \times \text{V1}) \div \text{T} = 3.125 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

ACP 活性单位定义: 30℃每克样品每分钟催化水解产生 1μmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{ACP 活性 (U/g)} = C \text{ 标准品} \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times \text{稀释倍数} \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V2}) \div \text{T} = 3.125 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{W}$$

3. 按照液体体积计算

ACP 活性单位定义: 30℃每毫升样品每分钟催化水解产生 1μmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{ACP 活性 (U/mL)} = C \text{ 标准品} \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times \text{稀释倍数} \div \text{V1} \div \text{T} = 3.125 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$$

4. 按照细胞数量计算

ACP 活性单位定义: 30℃每 10⁴个细胞每分钟催化水解产生 1μmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{ACP 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = C \text{ 标准品} \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times \text{稀释倍数} \div (\text{细胞数量} \times \text{V1} \div \text{V2}) \div \text{T} = 3.125 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

注: C 标准品: 0.25 μmol/mL 标准酪氨酸溶液; 稀释倍数: (20+40+40)÷40=2.5; 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; W: 样品质量 (g); V1: 加入反应体系中粗酶液体积 (mL), 20 μL=2×10⁻² mL; V2: 粗酶液总体积 (mL), 1mL; T: 催化反应时间 (min), 10min。