

## 中性蛋白酶（NP）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1526

产品规格：100管/48样

### 产品说明：

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。中性条件下，NP催化酪蛋白水解产生酪氨酸；在碱性条件下，酪氨酸还原磷钼酸化合物生成钨蓝；在680nm有特征吸收峰。

**注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 产品组成：

| 试剂名称 | 规格        | 保存条件 |
|------|-----------|------|
| 提取液  | 液体55mL×1瓶 | 4℃   |
| 试剂一  | 粉剂×1瓶     | 4℃   |
| 试剂二  | 粉剂×1瓶     | 4℃   |
| 试剂三  | 液体20mL×1瓶 | 4℃   |
| 试剂四  | 液体4mL×1瓶  | 4℃   |
| 标准品  | 液体1mL×1支  | 4℃   |

### 溶液的配制：

1. 试剂一：临用前加入4mL蒸馏水，充分溶解。
2. 试剂二：临用前加入4mL提取液，沸水浴中搅拌溶解。
3. 标准品：20 $\mu$ mol/mL标准酪氨酸。

### 需自备的仪器和用品：

研钵/匀浆器、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、1.5mLEP管、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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。

#### 二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至680nm，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. 标准溶液的配制：临用前将20 $\mu$ mol/mL标准液用蒸馏水稀释80倍至0.25 $\mu$ mol/mL标准溶液使用，现用现配。
4. 样本测定（1.5mLEP管中分别加入下列试剂）：

| 试剂名称（ $\mu$ L） | 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  |     |     |



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

|                            |     |     |     |     |
|----------------------------|-----|-----|-----|-----|
| 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。并计算 $\Delta A_{测定}=A_{测定管}-A_{对照管}$ 、 $\Delta A_{标准}=A_{标准管}-A_{空白管}$ 。

### 三、NP活性计算

#### 1. 按样本蛋白浓度计算

酶活单位定义: 30℃每毫克蛋白每分钟水解产生1μmol酪氨酸为一个酶活单位。

$$NP \text{ 活性 (U/mg prot)} = C_{标准品} \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times V1 \div (C_{pr} \times V2) \div T = 0.125 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div C_{pr}$$

#### 2. 按样本质量计算

酶活单位定义: 30℃每克样本每分钟催化水解产生1μmol酪氨酸为一个酶活单位。

$$NP \text{ 活性 (U/g 质量)} = C_{标准品} \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times V1 \div (W \times V2 \div V3) \div T = 0.125 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W$$

C标准品: 标准酪氨酸溶液浓度, 0.25μmol/mL; Cpr: 粗酶液蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; V1: 酶促反应总体积, 0.1mL; V2: 加入反应体系中粗酶液体积, 20μL=2×10<sup>-2</sup>mL; V3: 粗酶液总体积, 1mL; T: 催化反应时间, 10min。

### 注意事项:

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。

### 实验实例:

- 取0.1g兔脾脏加入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, 之后照测定步骤操作, 用96孔板测得计算 $\Delta A_{测定}=A_{测定管}-A_{对照管}=0.132-0.123=0.009$ ,  $\Delta A_{标准}=A_{标准管}-A_{空白管}=0.259-0.045=0.214$ 。按样本质量计算酶活得:

$$NP \text{ 活性 (U/g 质量)} = 0.125 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W = 0.125 \times 0.009 \div 0.214 \div 0.1 = 0.0526 \text{ U/g 质量}$$



扫一扫 加微信

**郑州乐业生物科技有限公司**

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com