

使用说明书

Instruction Manual

碱性蛋白酶(AKP)活性检测试剂盒（微量法）

Alkali Proteinase Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/48S 规格的产品组成如下:

组成	规格	储存条件
CB0018M-A	55mL ×1 瓶	4°C保存
CB0018M-B	粉剂×1 瓶	4°C保存
CB0018M-C	粉剂×1 瓶	4°C避光保存
CB0018M-D	粉剂×1 瓶	4°C保存
CB0018M-E	4mL ×1 瓶	4°C保存
CB0018M-Standard (0.25μmol/mL)	1mL ×1 支	4°C保存

注: 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品:

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、蒸馏水。

二、试剂预配制:

CB0018M-B: 临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解备用。

CB0018M-C: 临用前加入 5mL CB0018M-A 沸水浴中溶解。

CB0018M-D: 临用前加入 20mL 蒸馏水充分溶解备用。

三、粗酶液提取:

- 组织: 按照组织质量 (g): CB0018M-A 体积(mL)为 1: 5-10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL CB0018M-A) 冰浴匀浆, 8000g, 4°C离心 10min, 取上清, 即粗酶液, 置冰上待测。
- 血清或培养液: 直接测定。
- 细菌、真菌: 按照细胞数量 (10^4 个): CB0018M-A 体积 (mL) 为 500-1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL CB0018M-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°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

四、检测步骤：

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. CB0018M-B、C、D 置于 40°C水浴中保温 30min。
3. 按顺序加入下列试剂：

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)	空白管 (μL)	标准管 (μL)
样本	20	20		
CB0018M-B	40			
CB0018M-C		40		
混匀后置于 40°C水浴保温 10min。				
CB0018M-B		40		
CB0018M-C	40			
混匀后 10000rpm 4°C离心 10min，取上清。				
上清	40	40		
蒸馏水			40	
标准品				40
CB0018M-D	200	200	200	200
CB0018M-E	40	40	40	40

混匀后置于 40°C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 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ 、 $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。

- 注：**
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 1-2 次。

五、计算公式：

1. 按照样本蛋白浓度计算
AKP 活性单位定义：40°C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。
$$AKP \text{ 活性 (U/mg prot)} = C_{标准品} \times (A_{测定管} - A_{对照管}) \div (A_{标准管} - A_{空白管}) \times \text{稀释倍数} \div (Cpr \times V1) \div T = 3.125 \times (A_{测定管} - A_{对照管}) \div (A_{标准管} - A_{空白管}) \div Cpr$$
2. 按照样本质量计算
AKP 活性单位定义：40°C每克样品每分钟催化水解产生 1μmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。
$$AKP \text{ 活性 (U/g)} = C_{标准品} \times (A_{测定管} - A_{对照管}) \div (A_{标准管} - A_{空白管}) \times \text{稀释倍数} \div (W \times V1 \div V2) \div T = 3.125 \times (A_{测定管} - A_{对照管}) \div (A_{标准管} - A_{空白管}) \div W$$
3. 按照液体体积计算
AKP 活性单位定义：40°C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。
$$AKP \text{ 活性 (U/mL)} = C_{标准品} \times (A_{测定管} - A_{对照管}) \div (A_{标准管} - A_{空白管}) \times \text{稀释倍数} \div V1 \div T = 3.125 \times (A_{测定管} - A_{对照管}) \div (A_{标准管} - A_{空白管})$$
4. 按照细胞数量计算
AKP 活性单位定义：40°C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。
$$AKP \text{ 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = C_{标准品} \times (A_{测定管} - A_{对照管}) \div (A_{标准管} - A_{空白管}) \times \text{稀释倍数} \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V2) \div T = 3.125 \times (A_{测定管} - A_{对照管}) \div (A_{标准管} - A_{空白管}) \div \text{细胞数量}$$

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 TargetMol 蛋白质含量测定试剂盒(C0050)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

1. 临用前配制的试剂配置好后 3 天内使用完毕。
2. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
3. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

