

中性蛋白酶 (Neutral protease, NPT) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-D002 微板法 48 样)

一、产品简介:

蛋白酶广泛存在于动物内脏、植物茎叶、果实和微生物中, 中性蛋白酶 (NPT) 是在中性条件下将酪蛋白水解产生酪氨酸; 酪氨酸与福林酚在碱性条件下反应生成蓝色化合物; 该蓝色物质在 680nm 有特征吸收峰, 进而得中性蛋白酶活性, 由于底物酪蛋白自身含有多种氨基酸, 所以在检测过程中必须设置带有底物酪蛋白的对照, 以扣除有干扰的背景值, 排除假阳性。

二、测试盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×2 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 2 瓶	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 每瓶加入 3mL 试剂二 90°C加热搅拌至分散, 再加 27mL 提取液搅拌至溶解; 配置完的试剂 4°C保存, 三天内用完。
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	用前摇匀。
试剂三	液体 50mL×1 瓶	4°C保存	用前摇匀。
试剂四	液体 40mL×1 瓶	4°C保存	用前摇匀。
试剂五	液体 10mL×1 棕色瓶	4°C保存	现用现配, 用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 再加 20mL 蒸馏水, 4°C保存, 一星期内用完。
标准品	粉体 1 支 EP	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

【注】: 试剂一若在磁力搅拌器 (带温控) 上溶解, 可用锡箔纸或保鲜膜盖住烧杯, 以免溶解过程中水分蒸发过快。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪、蒸馏水

四、中性蛋白酶 (NPT) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本: 测定管和对照管分别取约 0.1g 组织 (水分充足的果实约 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆; 12000rpm, 4°C离心 15min; 取上清液待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

② 细菌/真菌样本: 测定管和对照管分别取约 500 万细胞加入 1mL 提取液, 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 12000rpm, 4°C离心 15min; 取上清液待测。

【注】: 若增加样本量, 按细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 比例进行提取

③ 液体样本: 澄清液体直接检测; 若浑浊则 12000rpm, 4°C离心 15min; 上清待测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 680nm, 配制好的试剂一需预先 50°C水浴 10min。

② 在 2mL 离心管中依次加入下列试剂培养:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	500	500
试剂一	500	
40°C振荡培养 10min, 同时, 余下的试剂一须单独 40°C振荡培养 10min		
上步单独 40°C培养的试剂一		500

试剂三	500	500
混匀，室温静置 10min，1500rpm（须准确），4℃离心 10min，上清液待用		

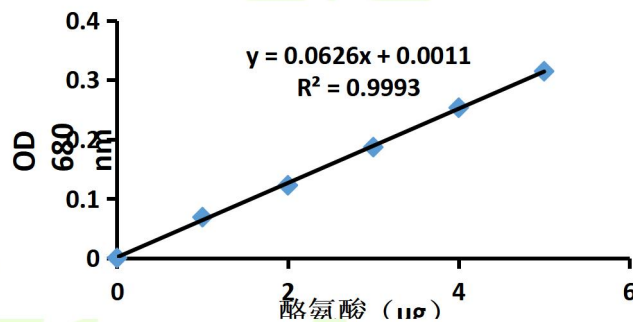
③ 显色反应：在 EP 管中依次加入：

上清液	250	250
试剂四	375	375
试剂五	250	250
40℃水浴 20min，取 200μL 澄清液（若浑浊，可 1500rpm 离心 10min）至 96 孔板中，于 680nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

- 【注】1.若 ΔA 在零附近徘徊，可以加大样本量（如增加到 0.2g），或延长 40℃培养时间（如增加至 30min），或在显色反应阶段加大上清液体积（如，增加至 350μL，则试剂五相应减少），则改变后的样本质量 W，反应时间 T 和显色步骤中的上清液体积 V1 需代入公式重新计算。
- 2.若测定管的 A 值大于 1.5，可减少样本取样量（如减少到 0.05g），或把上清液用蒸馏水进行稀释，稀释倍数 D 代入公式参与计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0626x + 0.0011$ ，x 是标准品质量（μg），y 是 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算：

活性单位定义：40℃每毫克蛋白每分钟催化水解产生 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{NPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0011) \div 0.0626 \times (V3 \div V2) \div (Cpr \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 19.2 \times (\Delta A - 0.0011) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

3、按照样本质量计算：

活性单位定义：40℃每克样品每分钟催化水解产生 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{NPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0011) \div 0.0626 \times (V3 \div V2) \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 19.2 \times (\Delta A - 0.0011) \div W \times D \end{aligned}$$

4、按照细胞数量计算：

活性单位定义：40℃每 10^4 个细胞每分钟催化水解产生 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{NPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0011) \div 0.0626 \times (V3 \div V2) \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 19.2 \times (\Delta A - 0.0011) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

活性单位定义：40℃每毫升液体样本每分钟催化水解产生 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{NPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.0011) \div 0.0626 \times (V3 \div V2) \div V4 \div T \times D = 19.2 \times (\Delta A - 0.0011) \times D$$

V---提取液体积，1mL； V1---样本体积，0.5mL； V2---显色步骤上清液体积，0.25mL；

V3---培养步骤总反应体积，1.5mL； V4---液体样本，0.5mL； 酪氨酸分子量---181.19；

T---反应时间，10min； W---样本质量，g； D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---粗酶液蛋白质浓度（mg/mL），建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒检测。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标准品母液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) : 标准品溶于 100mL 的 0.1mol/L 盐酸溶液中 (两天内用完且-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度标准品: 0, 4, 8, 12, 16, 20. $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。也可根据实际来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的显色反应阶段加样表依次加样, 根据结果即可制作标准曲线。

