

中性蛋白酶 (Neutral protease, NPT) 试剂盒说明书

(货号: G0414W 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、试剂盒组成和配制:

| 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 mg×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 mg×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 | | |

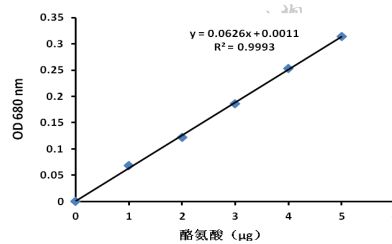
| | | |
|---|-----|-----|
| 上步单独 40°C 培养的试剂一 | | 500 |
| 试剂三 | 500 | 500 |
| 混匀，室温静置 10min，1500rpm（须准确），4°C 离心 10min，上清液待用 | | |

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°C 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， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。 | | |

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°C 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。

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

$$= 19.2 \times (\Delta A - 0.0011) \div Cpr \times D$$

3、按照样本质量计算：

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

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

$$= 19.2 \times (\Delta A - 0.0011) \div W \times D$$

4、按照细胞数量计算：

活性单位定义：40°C 每 10⁴ 个细胞每分钟催化水解产生 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位。

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

$$= 19.2 \times (\Delta A - 0.0011) \div \text{细胞数量} \times D$$

5、按液体体积计算：

活性单位定义：40°C 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（100μg/mL）：标准品溶于 100mL 的 0.1mol/L 盐酸溶液中（两天内用完且-20°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. μg/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。

