

中性蛋白酶 (Neutral protease, NP) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/48S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。

测定原理：

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。

自备仪器和用品：

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 管和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 4mL 蒸馏水溶解。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加入 10mL 试剂一，沸水浴中磁力搅拌溶解。（可在烧杯上盖一层保鲜膜，注意观察，避免水分全部蒸发，一般加热 15-30 分钟，该试剂为过饱和试剂，充分混匀后仍出现颗粒物不溶物不影响使用）。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 20mL 蒸馏水溶解。

试剂五：液体 4mL×1 瓶，4℃ 保存。

标准品：液体 1mL×1 支，0.25μmol/mL 标准酪氨酸溶液，4℃ 保存。

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量 (g)：试剂一体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）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)：试剂一体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），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. 试剂二、试剂三和试剂四置于 30℃ 水浴保温 30min。
3. **对照管：**取 0.5 mL EP 管，加入 20μL 粗酶液，40μL 试剂二，混匀后置于 30℃ 水浴保温 10min；加入 40μL 试剂三，混匀后 8000g，4℃ 离心 10min；取 40μL 上清液，加入新的 EP 管，再加入 200μL 试剂四，40μL 试剂五，混匀后置于 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，记为 A 对照管。
4. **测定管：**取 0.5 mL EP 管，加入 20μL 粗酶液，40μL 试剂三，混匀后置于 30℃ 水浴保温 10min；加入 40μL 试剂二，混匀后 8000g，4℃ 离心 10min；取 40μL 上清液，加入新的 EP 管，再加入 200μL 试剂四，40μL 试剂五，混匀后置于 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，记为 A 测定管。（注意与空白管不同，先加试剂三，后加试剂二）

5. **空白管**: 取 0.5 mL EP 管, 加入 40 μ L 蒸馏水, 200 μ L 试剂四, 40 μ L 试剂五, 混匀后置于 30 $^{\circ}$ C 水浴保温 20min, 取 200 μ L 于微量玻璃比色皿/96 孔板, 于 680nm 测定光吸收, 记为 A 空白管。

6. **标准管**: 取 0.5 mL EP 管, 加入 40 μ L 标准品, 200 μ L 试剂四, 40 μ L 试剂五, 混匀后置于 30 $^{\circ}$ C 水浴保温 20min, 取 200 μ L 于微量玻璃比色皿/96 孔板, 于 680nm 测定光吸收, 记为 A 标准管。

注意: 空白管和标准管只需要测定一次。

计算公式:

1. 按照样本蛋白浓度计算

NP 活性单位定义: 30 $^{\circ}$ C 每毫克蛋白每分钟水解产生 1nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

NP 活性 (nmol/min /mg prot) = C 标准品 $\times$ (A 测定管 - A 对照管) $\div$ (A 标准管 - A 空白管) $\times$ V 反总 $\div$ (Cpr $\times$ V1) $\div$ T = 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

NP 活性单位定义: 30 $^{\circ}$ C 每克样品每分钟催化水解产生 1 nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

NP 活性 (nmol/min /g 鲜重) = C 标准品 $\times$ (A 测定管 - A 对照管) $\div$ (A 标准管 - A 空白管) $\times$ V 反总 $\div$ (W $\times$ V1 $\div$ V2) $\div$ T = 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

NP 活性单位定义: 30 $^{\circ}$ C 每毫升样品每分钟催化水解产生 1nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

NP 活性 (nmol/min/mL) = C 标准品 $\times$ (A 测定管 - A 对照管) $\div$ (A 标准管 - A 空白管) $\times$ V 反总 $\div$ V1 $\div$ T = 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

NP 活性单位定义: 30 $^{\circ}$ C 每 10⁴ 个细胞每分钟催化水解产生 1nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

NP 活性 (nmol/min /10⁴ cell) = C 标准品 $\times$ (A 测定管 - A 对照管) $\div$ (A 标准管 - A 空白管) $\times$ V 反总 $\div$ (细胞数量 $\times$ V1 $\div$ V2) $\div$ T = 125 $\times$ (A 测定管 - A 对照管) $\div$ (A 标准管 - A 空白管) $\div$ 细胞数量

C 标准品: 0.25 μ mol/mL 标准酪氨酸溶液; V 反总: 酶促反应总体积, 0.1mL; Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL); V1: 加入反应体系中粗酶液体积 (mL), 0.02 mL; V2: 提取液总体积 (mL), 1mL; T: 催化反应时间 (min), 10min; W: 样品质量 (g)。

注意事项:

临用前配制的试剂配制好后 4 $^{\circ}$ C 保存, 并且 3 天内使用完毕。