

Acid protease (ACPT) Assay Kit

酸性蛋白酶（ACPT）试剂盒说明书

货号:BN72463|方法: 可见分光法| 规格: 24 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,酸性蛋白酶(ACPT)是在酸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,进而得酸性蛋白酶活性,

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×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×2 瓶	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部,每瓶加入 3mL 试剂二 90℃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℃保存,三天内用完。
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	用前摇匀。
试剂三	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	用前摇匀。
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	用前摇匀。
试剂五	液体 5mL×1 棕色瓶	4℃保存	现用现配,用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部,临用前加 10mL 蒸馏水, 4℃保存,一星期内用完。
标准品	粉体 mg×1 支 EP	4℃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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪。

四、酸性蛋白酶(ACPT)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℃离心 15min,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℃离心 15min,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℃离心 15min;上清待测。

2、上机检测:

- ① 分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 680nm,蒸馏水调零。
- ② 配制好的试剂一需预先 50℃水浴 10min,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
----------	-----	-----

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

样本	500	500
试剂一	500	
40℃振荡培养 10min, 同时, 余下的试剂一须单独 40℃振荡培养 10min		
上步单独 40℃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		

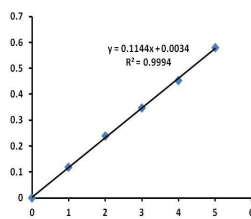
③ 显色反应: 在 EP 管中依次加入:

上清液	250	250
试剂四	375	375
试剂五	250	250
40℃水浴 20min, 取全部澄清液 (若浑浊, 可 1500rpm 离心 10min) 转移至 1mL 玻璃比色皿中, 于 680nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定管-A 对照管。		

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调; 针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.1144x + 0.0034$, x 是标准品质量 (μg), y 是 ΔA 。



标准曲线示意图

说明: 标准曲线由标准品测定获得, 具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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 $1\mu\text{g}$ 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ACPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0034) \div 0.1144 \times (V3 \div V2) \div (Cpr \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 10.5 \times (\Delta A - 0.0034) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

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 $1\mu\text{g}$ 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ACPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0034) \div 0.1144 \times (V3 \div V2) \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 10.5 \times (\Delta A - 0.0034) \div W \times D \end{aligned}$$

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 $1\mu\text{g}$ 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ACPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0034) \div 0.1144 \times (V3 \div V2) \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 10.5 \times (\Delta A - 0.0034) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

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 $1\mu\text{g}$ 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{ACPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.0034) \div 0.1144 \times (V3 \div V2) \div V4 \div T \times D = 10.5 \times (\Delta A - 0.0034) \times D$$

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。