Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd
Tel: 400-968-6088
Fax: 010-56371281
Http://www.solarbio.com

碱性蛋白酶（AKP）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC2305

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 55mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	4℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存
试剂四	液体 4mL×1 瓶	4℃保存
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存

溶液的配制：

1、 试剂一：临用前加入 4mL 蒸馏水，充分溶解；

2、 试剂二：临用前取 1 瓶加入 3mL 提取液，沸水浴中搅拌溶解；

3、 标准品：20μmol/mL 标准酪氨酸。

产品说明：

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。

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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

研钵/匀浆器、台式离心机、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。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

称约0.1g组织，加入1mL提取液，冰上充分研磨，10000rpm 4℃离心10min，取上清，即粗酶液，置冰上待测。或直接称取0.1g酶制品，加入1mL提取液，置冰上待测。

二、测定步骤

1、 分光光度计/酶标仪预热30min 以上，调节波长至680nm，蒸馏水调零。

2、 试剂一、试剂二和试剂三置于40℃水浴保温30min以上。

3、 标准溶液的配制：临用前将20μmol/mL标准液用蒸馏水稀释80倍至0.25μmol/mL 标准溶液使用，现用现配。

4、 样本测定：(1.5mLEP管中分别加入下列试剂)

试剂名称（μL）	对照管	测定管	空白管	标准管
粗酶液	20	20		
试剂一	40			
试剂二		40		
混匀后40℃水浴保温10min				
试剂一		40		
试剂二	40			
混匀后10000rpm 4℃离心10min，取上清				
上清	40	40		
蒸馏水			40	
标准品				40
试剂三	200	200	200	200
试剂四	40	40	40	40
混匀后40℃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ΔA测定=A测定管-A对照管、ΔA标准=A标准管-A空白管。空白管和标准管只需做1-2次

三、碱性蛋白酶活性计算

1、按样本蛋白浓度计算

酶活单位定义：40℃每毫克蛋白每分钟催化水解产生 1μmol 酪氨酸为一个酶活单位。

AKP 活性（U/mg prot）=C 标准品×ΔA 测定÷ΔA 标准×V1÷（Cpr×V2）÷T=0.125×ΔA 测定÷ΔA 标准÷Cpr

2、按样本质量计算

酶活单位定义：40℃每克样本每分钟催化水解产生 1μmol 酪氨酸为一个酶活单位。

AKP 活性（U/g 质量）=C 标准品×ΔA 测定÷ΔA 标准×V1÷（W×V2÷V3）÷T=0.125×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W

C 标准品：标准酪氨酸溶液浓度，0.25μmol/mL；Cpr：粗酶液蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；V1：酶促反应总体积，0.1mL；V2：加入反应体系中粗酶液体积，20μL=2×10^{-2} mL；V3：粗酶液总体积，1mL；T：催化反应时间，10min。

注意事项：

若反应较弱，（A 测定管-A 对照管）差值较小，可适当延长反应时间（20-30min），即第一步水浴时间，最后计算酶活时对公式进行修改。

相关系列产品：

BC2280/BC2285 酸性蛋白酶（ACP）活性检测试剂盒

BC2290/BC2295 中性蛋白酶（NP）活性检测试剂盒