

中性蛋白酶（NP）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1526

产品规格：100管/48样

产品说明：

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。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。

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。

产品组成：

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

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：临用前加入4mL提取液，沸水浴中搅拌溶解。
3. 标准品：20μmol/mL标准酪氨酸。

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、1.5mLEP管、冰和蒸馏水。

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30℃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			



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

试剂二		40		
混匀后30℃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，分别记为A对照管、A测定管、A空白管、A标准管。并计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ 、 $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。

三、NP活性计算

1. 按样本蛋白浓度计算

酶活单位定义：30℃每毫克蛋白每分钟水解产生1μmol酪氨酸为一个酶活单位。

$$NP \text{ 活性 (U/mg prot) } = C_{\text{标准品}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_1 \div (C_{\text{pr}} \times V_2) \div T = 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算

酶活单位定义：30℃每克样本每分钟催化水解产生1μmol酪氨酸为一个酶活单位。

$$NP \text{ 活性 (U/g 质量) } = C_{\text{标准品}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_1 \div (W \times V_2 \div V_3) \div T = 0.125 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

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=2×10⁻²mL；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。

实验实例：

- 取0.1g兔脾脏加入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，之后照测定步骤操作，用96孔板测得计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管} = 0.132 - 0.123 = 0.009$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管} = 0.259 - 0.045 = 0.214$ 。按样本质量计算酶活得：

$$NP \text{ 活性 (U/g 质量) } = 0.125 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W = 0.125 \times 0.009 \div 0.214 \div 0.1 = 0.0526 \text{ U/g 质量。}$$



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com