

Seebio®中性蛋白酶 (Neutralprotease) 活性测定试剂盒 (Folin 法) 说明书

【产品名称】

Seebio®中性蛋白酶 (Neutralprotease) 活性测定试剂盒 (Folin 法)

【产品编码】

DDM1916A

【包装规格】

货号	序号	名称组份及包装规格
DDM191 6A-48T	1	标准液 (100µg/ml): 1×1ml
	2	10×反应液: 1×10ml
	3	底物 (粉剂): 1×1 瓶
	4	沉淀剂 (粉剂): 1×1 瓶
	5	显色液 A (粉剂): 1×1 瓶
	6	显色液 B: 1×4ml
	7	96 孔微孔板: 1 块
	8	助溶剂: 1×0.5ml

【检测原理和用途】

中性蛋白酶 (Neutralprotease, NP) 能够在中性 pH 条件下水解蛋白质, 具有安全无毒、水解能力强、作用范围广、反应条件温和等特点, 被广泛用于食品工业、乳制品加工、饲料、化妆品、营养保健品、科学研究等领域。本试剂盒的检测原理基于中性条件下, NP 催化酪蛋白水解产生酪氨酸, 酪氨酸进一步在碱性条件下还原磷钼酸化合物生成钨蓝, 从而产生 680nm 处的特征性吸收峰, 通过吸光值变化来表征中性蛋白酶的活性。

【酶活定义】

在 40°C、pH7.2 条件下, 1min 内水解酪蛋白产生相当于 1µg 酚基氨基酸的酶量为 1 个酶活单位。

【使用说明】

一、试剂盒使用前准备

- 请事先准备好酶标仪、无菌离心管、水浴锅、磁力搅拌器、微量移液器和纯水等。
- 10×反应液用无菌水按 1:10 稀释至 1×, 4°C 存放;
- 底物 (粉剂) 加 10ml 反应液及 0.2ml 的助溶剂, 瓶盖勿拧紧, 于 95°C 水浴 20min, 每 5min 震荡混匀 1 次,

冷却至室温备用。于 4°C 存放不超过 3 天, -20°C 可长期保存。

4. 沉淀剂 (粉剂) 加 5ml 纯水, 室温震荡溶解。

5. 显色液 A (粉剂) 加 20ml 纯水, 室温震荡溶解。

二、样品制备

1. 组织样品

按照组织质量(g):反应液(ml)=1:5~10 的比例混合, 冰浴匀浆后, 4°C, 8000g 离心 10min, 取上清, 得粗酶液, 冰浴待测。

2. 血清或培养液

直接作为粗酶液进行测定。

3. 细菌、真菌样品

按照 5×10^6 个细胞加 1ml 反应液的比例重悬细胞, 冰浴超声波破碎细胞 (300w, 3s/7s, 3min); 然后于 4°C, 8000g 离心 10min, 取上清, 得粗酶液, 冰浴待测。

三、检测步骤

1. 酶标仪开机预热 30min, 调节检测波长至 680nm。

2. 标准曲线绘制

(1) 用反应液稀释 100µg/ml 的酪氨酸标准液, 成 0、10、20、30、40、50、60µg/ml 的标准工作溶液。

(2) 分别取 40µl 各浓度的标准工作液, 加入对应 EP 管内, 在每管中加入 200µl 显色液 A 和 40µl 显色液 B, 混匀, 40°C 水浴 20min。

(3) 将各标准反应液加入 96 孔板, 200µl/孔, 测定 680nm 光吸收值。以 L-酪氨酸含量为 x 轴, 对应吸光度值为 y 轴, 绘制标准曲线, $r^2 \geq 0.9900$ 。

3. 样品测定

(1) 分别取 40µl 纯水 (对照组) 和 40µl 粗酶液 (检测组) 置于 EP 管中, 于 40°C 水浴 5min。配制好的底物液同时同样处理;

(2) 在对照组和检测组试管中分别加入 40µl 底物液, 混匀, 40°C 水浴 10min ;

(3) 各管加入 80µl 沉淀剂, 混匀, 40°C 水浴 10min;

然后于 12000g 离心 5min；取 40μl 上清液加入新的 EP 管内；

(3) 加入 200μl 显色液 A 和 40μl 显色液 B，混匀，40°C 水浴 20min，取 200μl 加入 96 孔板内，测定 680nm 的光吸收值。

4. 结果计算

(1) 检查并确定样品的 680nm 光吸收值位于标准曲线的检测区间内，如果高出或低于这一区间，应对样品进行稀释或浓缩，直至检测值位于标准区间之内；

(2) 根据标准方程计算出样品中的酪氨酸浓度 C (μg/ml)；

(3) 样品中中性蛋白酶活力以 X_i 表示，按以下公式计算：

$$X_i = \frac{(C - C_0) \times N \times 0.16}{M \times 10 \times 0.04}$$

式中：

X_i —酶活浓度 (U/ml)；

C—样品管的酪氨酸浓度 (μg/ml)；

C_0 —空白管的酪氨酸浓度 (μg/ml)；

N—稀释或浓缩倍数；

M—L-酪氨酸的摩尔质量 (181.20g/mol)；

0.16—酶反应体系总体积，单位为毫升 (mL)；

0.04—参与反应酶样品体积，单位为 ml；

10—反应时间 (min)。

【储存条件和有效期】

2-8°C 储存，有效期 12 个月。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅供科研用途，不得用于临床诊断；
2. 适当延长酶液和底物的反应时间会提高检测的灵敏度，计算时要做相应修改；
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套作。

【技术支持服务】

您若有疑问或反馈，请联系：

Tel: 021-50272981*6217 或 Email: market@seebio.cn

西宝生物二维码

