

中性蛋白酶（NP）检测试剂盒（分光光度法）

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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 90mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 10 mL 蒸馏水溶解。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加入 20 mL 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 50 mL 蒸馏水溶解。

试剂五：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

标准品：液体 1mL×1 支，0.25 μmol/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（ 10^4 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：**取一支 EP 管，加入 100μL 粗酶液，200μL 试剂二，混匀后置于 30℃ 水浴保温 10min；加入 200μL 试剂三，混匀后 8000g，4℃ 离心 10min；取 200μL 上清液，加入新的 EP 管，再加入 1000μL 试剂四，200μL 试剂五，混匀后置于 30℃ 水浴保温 20min，于 680nm 测定光吸收，记为 A 对照管。

- 测定管:** 取一支 EP 管, 加入 100 μ L 粗酶液, 200 μ L 试剂三, 混匀后置于 30 $^{\circ}$ C 水浴保温 10min; 加入 200 μ L 试剂二, 混匀后 8000g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min; 取 200 μ L 上清液, 加入新的 EP 管, 再加入 1000 μ L 试剂四, 200 μ L 试剂五, 混匀后置于 30 $^{\circ}$ C 水浴保温 20min, 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)
- 空白管:** 取 EP 管, 加入 200 μ L 蒸馏水, 1000 μ L 试剂四, 200 μ L 试剂五, 混匀后置于 30 $^{\circ}$ C 水浴保温 20min, 于 680nm 测定光吸收, 记为 A 空白管。
- 标准管:** 取 EP 管, 加入 200 μ L 标准品, 1000 μ L 试剂四, 200 μ L 试剂五, 混匀后置于 30 $^{\circ}$ C 水浴保温 20min, 于 680nm 测定光吸收, 记为 A 标准管。

注意: 空白管和标准管只需测定一次。

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。

$$\begin{aligned} \text{NP 活性 (nmol/min /mg prot)} &= C \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \\ &\div (Cpr \times V1) \div T &= 125 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{NP 活性 (nmol/min /g 鲜重)} &= C \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \\ &\div (W \times V1 \div V2) \div T &= 125 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{NP 活性 (nmol/min/mL)} &= C \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \\ &\div V1 \div T &= 125 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{NP 活性 (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} &= C \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \\ &\div (\text{细胞数量} \times V1 \div V2) \div T &= 125 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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, 0.5mL;

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), 0.1 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。