

中性蛋白酶（NP）检测试剂盒（微量法）

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 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 4mL 蒸馏水溶解。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加入 10mL 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 20mL 蒸馏水溶解。

试剂五：液体 4mL×1 瓶，4℃ 保存。

标准品：液体 1mL×1 支，0.25 μ mol/mL 标准酪氨酸溶液，4℃ 保存。

粗酶液提取：

- 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。
- 血清或培养液：**直接测定。
- 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。

测定步骤：

- 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长到 680 nm，蒸馏水调零。
- 试剂二、试剂三和试剂四置于 30℃ 水浴保温 30min。
- 对照管：**取 0.5 mL EP 管，加入 20 μ L 粗酶液，40 μ L 试剂二，混匀后置于 30℃ 水浴保温 10min；加入 40 μ L 试剂三，混匀后 8000g，4℃ 离心 10min；取 40 μ L 上清液，加入新的 EP 管，再加入 200 μ L 试剂四，40 μ L 试剂五，混匀后置于 30℃ 水浴保温 20min，取 200 μ L 于微量玻璃比色皿/96 孔板，于 680nm 测定光吸收，记为 A 对照管。

- 测定管：**取 0.5 mL EP 管，加入 20 μ L 粗酶液，40 μ L 试剂三，混匀后置于 30 $^{\circ}$ C 水浴保温 10min；加入 40 μ L 试剂二，混匀后 8000g，4 $^{\circ}$ C 离心 10min；取 40 μ L 上清液，加入新的 EP 管，再加入 200 μ L 试剂四，40 μ L 试剂五，混匀后置于 30 $^{\circ}$ C 水浴保温 20min，取 200 μ L 于微量玻璃比色皿/96 孔板，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 0.5 mL EP 管，加入 40 μ L 蒸馏水，200 μ L 试剂四，40 μ L 试剂五，混匀后置于 30 $^{\circ}$ C 水浴保温 20min，取 200 μ L 于微量玻璃比色皿/96 孔板，于 680nm 测定光吸收，记为 A 空白管。
- 标准管：**取 0.5 mL EP 管，加入 40 μ L 标准品，200 μ L 试剂四，40 μ L 试剂五，混匀后置于 30 $^{\circ}$ C 水浴保温 20min，取 200 μ L 于微量玻璃比色皿/96 孔板，于 680nm 测定光吸收，记为 A 标准管。

注意：空白管和标准管只需要测定一次。

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。

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

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。

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

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。

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

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，0.1mL；

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)，0.02 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。