



中性蛋白酶(NPT)试剂盒

可见分光光度法

货号: R43903-24S

产品简介:

蛋白酶广泛存在于动物内脏、植物茎叶、果实和微生物中, 中性蛋白酶 (NPT) 是在中性条件下将酪蛋白水解产生酪氨酸; 酪氨酸与福林酚在碱性条件下反应生成蓝色化合物; 该蓝色物质在680nm 有特征吸收峰, 进而得中性蛋白酶活性,

由于底物酪蛋白自身含有多种氨基酸, 所以在检测过程中必须设置带有底物酪蛋白的对照, 以扣除有干扰的背景值, 排除假阳性。

测试盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体120mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂mg×2瓶	4℃保存	用前甩几下或4℃离心使试剂落入试管底部, 每瓶加入3mL试剂二90℃加热搅拌至分散, 再加27mL提取液搅拌至溶解; 配置完的试剂4℃保存, 三天内用完。
试剂二	液体10mL×1瓶	4℃保存	用前摇匀。
试剂三	液体25mL×1瓶	4℃保存	用前摇匀。
试剂四	液体20mL×1瓶	4℃保存	用前摇匀。
试剂五	液体5mL×1棕色瓶	4℃保存	现用现配, 用前甩几下或4℃离心使试剂落入试管底部, 临用前加10mL蒸馏水, 4℃保存, 一星期内用完。
标准品	粉体mg×1支EP	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

【注】:试剂一若在磁力搅拌器(带温控)上溶解, 可用锡箔纸或保鲜膜盖住烧杯, 以免溶解过程中水分蒸发过快。

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径1cm)、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪。



中性蛋白酶 (NPT) 活性测定:

建议正式实验前选取2个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

①组织样本: 测定管和对照管分别取约0.1g 组织(水分充足的果实约0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆; 12000rpm, 4℃ 离心15min; 取上清液待测。

【注】:若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为1:5~10的比例进行提取

②细菌/真菌样本: 测定管和对照管分别取约500万细胞加入1mL 提取液, 冰浴超声波破碎细胞(功率300w, 超声3秒, 间隔7秒, 总时间3min); 12000rpm, 4℃ 离心15min; 取上清液待测。

【注】:若增加样本量, 按细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积 (mL) 为 500~1000:1比例进行提取

③液体样本: 澄清液体直接检测; 若浑浊则12000rpm, 4℃ 离心15min; 上清待测。

2、上机检测:

①分光光度计预热30min 以上, 调节波长至680nm, 蒸馏水调零

②配制好的试剂一需预先50℃水浴10min, 在2mL离心管中依次加入下列试剂培养:

试剂名称(μL)	测定管	对照管
样本	500	500
试剂一	500	
40℃振荡培养10min, 同时, 余下的试剂一须单独40℃振荡培养10min		
上步单独40℃培养的试剂一		500
试剂三	500	500
混匀, 室温静置10min, 1500rpm(须准确), 4℃离心10min, 上清液待用		

③显色反应: 在EP管中依次加入:

上清液	250	250
-----	-----	-----



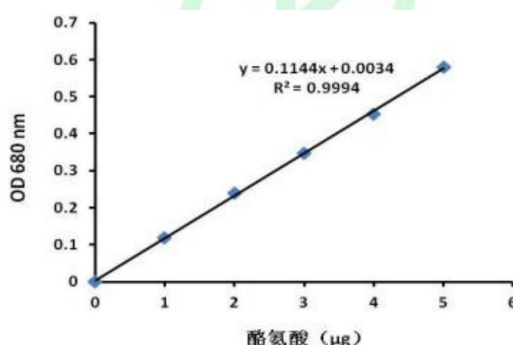
试剂四	375	375
试剂五	250	250
40℃水浴20min,取全部澄清液(若浑浊,可1500rpm离心10min)转移至1mL玻璃比色皿中,于680nm读取吸光值A,△A=A测定管-A对照管。		

【注】1.若△A在零附近徘徊,可以加大样本量(如增加到0.2g),或延长40℃培养时间(如增加至30min),或在显色反应阶段加大上清液体积(如,增加至350μL,则试剂五相应减少),则改变后的样本质量W,反应时间T和显色步骤中的上清液体积V1需代入公式重新计算。

2.若测定管的A值大于1.5,可减少样本取样量(如减少到0.05g),或把上清液用蒸馏水进行稀释,稀释倍数D代入公式参与计算。

结果计算:

1、标准曲线方程: $y=0.1144x+0.0034$, x是标准品质量(μg), y是△A。



2、按照蛋白浓度计算:

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

$$\begin{aligned}\text{NPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0034) \div 0.1144 \times (V3 \div V2) \div (C_{\text{pr}} \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 10.5 \times (\Delta A - 0.0034) \div C_{\text{pr}} \times D\end{aligned}$$

3、按照样本质量计算:

活性单位定义: 40℃每克样品每分钟催化水解产生1 μg 酪氨酸为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{NPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0034) \div 0.1144 \times (V3 \div V2) \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 10.5 \times (\Delta A - 0.0034) \div W \times D\end{aligned}$$



4、按照细胞数量计算:

活性单位定义: 40℃每10⁴个细胞每分钟催化水解产生1μg 酪氨酸为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{NPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= (\Delta A - 0.0034) \div 0.1144 \times (V3 \div V2) \div (\text{细胞数量} \\ &\times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 10.5 \times (\Delta A - 0.0034) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算:

活性单位定义: 40℃每毫升液体样本每分钟催化水解产生1μg 酪氨酸为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{NPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) &= (\Delta A - 0.0034) \div 0.1144 \times (V3 \div V2) \div V4 \div T \times D \\ &= 10.5 \times (\Delta A - 0.0034) \times D \end{aligned}$$

V---提取液体积, 1mL;

V1---样本体积, 0.5mL;

V2--- 显色步骤上清液体积, 0.25mL;

V3--- 培养步骤总反应体积, 1.5mL;

V4---液体样本, 0.5mL;

酪氨酸分子量---181.19;

T---反应时间, 10min;

W---样本质量, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为1;

Cpr---粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的BCA 蛋白质含量测定试剂盒检测。

附: 标准曲线制作过程:

1.标准品母液(100μg/mL): 标准品溶于100mL的0.1mol/L盐酸溶液中(两天内用完且-20℃保存)。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

2.把母液稀释成六个浓度梯度标准品: 0,4,8,12,16,20. $\mu\text{g/mL}$ 。也可根据实际来调整标准品浓度。

3.依据测定管的显色反应阶段加样表依次加样, 根据结果即可制作标准曲线。



源叶