

中性蛋白酶（Neutral protease, NP）活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/48S

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。

自备仪器和用品：

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、1.5 mL EP管和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体100mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：粉剂×1瓶，4°C保存。临用前加4mL蒸馏水溶解。

试剂三：粉剂×1瓶，4°C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°C保存。临用前加20mL蒸馏水溶解。

试剂五：液体4mL×1瓶，4°C保存。

标准品：液体1mL×1支，0.25 μ mol/mL标准酪氨酸溶液，4°C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°C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（10⁴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°C，离心10min，取上清置于冰上待测。

测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热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°C水浴保温30min。

3. **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°C水浴保温10min；加入40 μ L试剂三，混匀后8000g，4°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°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对照管。

4. **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°C水浴保温10min；加入40 μ L试剂二，混匀后8000g，4°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°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）

5. **空白管**：取0.5 mL EP管，加入40μL蒸馏水，200μL试剂四，40μL试剂五，混匀后置于30°C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，记为A空白管。

6. **标准管**：取0.5 mL EP管，加入40μL标准品，200μL试剂四，40μL试剂五，混匀后置于30°C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，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°C每毫克蛋白每分钟水解产生1nmol酪氨酸为1个酶活单位。

NP活性 (nmol/min /mg prot) = $C_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反应总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_1) \div T = 125 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}$

2. 按照样本质量计算

NP活性单位定义：30°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。

NP活性 (nmol/min /g鲜重) = $C_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反应总}} \div (W \times V_1 \div V_2) \div T = 125 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div W$

3. 按照液体体积计算

NP活性单位定义：30°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。

NP活性 (nmol/min/mL) = $C_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反应总}} \div V_1 \div T = 125 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}})$

按照细胞数量计算

NP活性单位定义：30°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。

NP活性 (nmol/min /104 cell) = $C_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反应总}} \div (\text{细胞数量} \times V_1 \div V_2) \div T = 125 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$

C标准品：0.25 μ mol/mL标准酪氨酸溶液；V反应总：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°C保存，并且3天内使用完毕。