

# 酸性蛋白酶 (Acid protease, ACPT) 试剂盒说明书

(分光法 24 样)

## 一、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,酸性蛋白酶(ACPT)是在酸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,进而得酸性蛋白酶活性,

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。

## 二、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°C保存 |   |
| 试剂一  | 粉剂 mg×2 瓶    | 4°C保存 | 用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部,每瓶加入 3mL 试剂二 90°C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°C保存,三天内用完。 |
| 试剂二  | 液体 10mL×1 瓶  | 4°C保存 | 用前摇匀。   |
| 试剂三  | 液体 25mL×1 瓶  | 4°C保存 | 用前摇匀。   |
| 试剂四  | 液体 20mL×1 瓶  | 4°C保存 | 用前摇匀。   |
| 试剂五  | 液体 5mL×1 棕色瓶 | 4°C保存 | 现用现配,用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部,临用前加 10mL 蒸馏水, 4°C保存,一星期内用完。                             |
| 标准品  | 粉体 mg×1 支 EP | 4°C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。

## 三、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。

## 四、酸性蛋白酶 (ACPT) 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°C离心 15min,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°C离心 15min,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°C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°C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°C振荡培养 10min,同时,余下的试剂一须单独 40°C振荡培养 10min |     |     |
| 上步单独 40°C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：

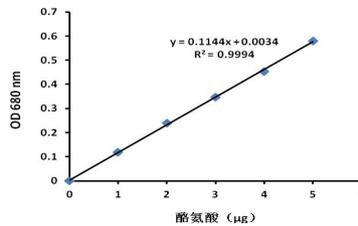
|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 上清液   | 250 | 250 |
| 试剂四   | 375 | 375 |
| 试剂五   | 250 | 250 |
| 40℃水浴 20min，取全部澄清液（若浑浊，可 1500rpm 离心 10min）转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 680nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定管 - A 对照管。 |     |     |

【注】1.若 $\Delta A$  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 350 $\mu$ L，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。

## 五、结果计算：

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



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 $\mu$ g 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{ACPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.0034) \div 0.1144 \times (V3 \div V2) \div (Cpr \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 10.5 \times (\Delta A - 0.0034) \div Cpr \times D$$

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 $\mu$ g 酪氨酸为 1 个酶活单位。

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

$$= 10.5 \times (\Delta A - 0.0034) \div W \times D$$

4、按照细胞数量计算：

活性单位定义：40℃每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化水解产生 1 $\mu$ g 酪氨酸为 1 个酶活单位。

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

$$= 10.5 \times (\Delta A - 0.0034) \div \text{细胞数量} \times D$$

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 1 $\mu$ g 酪氨酸为 1 个酶活单位。

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

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（100 $\mu$ g/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）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度标准品：0, 4, 8, 12, 16, 20.  $\mu$ 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。