

中性蛋白酶检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1132

保存：4℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：组织、细菌、真菌、血清（浆）或培养液等液体样本

中性蛋白酶（Neutral protease, 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。本试剂盒提供了一种简单、快速的中性蛋白酶检测方法，其检测原理是：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。通过测定其吸光度增加，来计算 NP 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃保存
试剂一	粉剂×1瓶	粉剂×1瓶	4℃保存
试剂二	粉剂×1瓶	粉剂×1瓶	4℃避光保存
试剂三	粉剂×1瓶	粉剂×1瓶	4℃保存
试剂四	2mL	4mL	4℃避光保存
标准品	1mL	1mL	4℃保存

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 680nm 处的吸光度）

水浴锅、制冰机、低温离心机

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

去离子水

匀浆器

试剂准备

提取液：即用型；4℃避光保存。

试剂一：临用前 48T 加 2mL 去离子水，96T 加 4mL 去离子水；充分溶解。未用完的试剂 4 度保存。

试剂二：临用前 48T 加入 5mL 提取液，96T 加入 10mL 提取液，沸水浴中搅拌溶解，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。

试剂三：临用前 48T 加入 10mL 去离子水，96T 加入 20mL 去离子水，充分溶解。未用完的试剂 4 度保存。

试剂四：即用型；使用前平衡到室温；4℃避光保存。

标准品：50 μg/mL 标准酪氨酸溶液，4℃保存。

样本制备

组织：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）。

细菌或真菌：收集 500 万细菌或真菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细菌或真菌，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细菌或真菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 8,000g，4℃离心 20min，取上清液，置冰上待测。

产品说明书

血清或培养液等液体样本：直接测定。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存1个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用BCA法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 680nm，可见光分光光度计去离子水调零。
2. 试剂一、试剂二和试剂三置于 30℃ 水浴保温 30min。
3. 样本测定（在 EP 管中加入下列试剂）：

	标准 (μL)	空白 (μL)	测定 (μL)	对照 (μL)
样本	0	0	20	20
试剂一	0	0	0	40
试剂二	0	0	40	0
混匀后置于 30℃ 水浴保温 10min				
试剂一	0	0	40	0
试剂二	0	0	0	40
混匀后 8000g, 4℃ 离心 10min; 取 40 μL 上清液, 加入新的 EP 管				
上清	0	0	40	40
去离子水	0	40	0	0
标准品	40	0	0	0
试剂三	200	200	200	200
试剂四	40	40	40	40

混匀后置于 30℃ 水浴保温 20min，取 200 μL 于 96 孔板或微量玻璃比色皿，测定 680nm 处的吸光值。计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。每个测定管需设一个对照，标准和空白只需要测一次。

注意：1. 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 $\Delta A_{\text{测}}$ 小于 0.005 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{\text{测}}$ 大于 0.3，样本可用去离子水进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。

结果计算

1. 按照样本质量计算

单位的定义：30℃ 每 g 组织在反应体系每分钟催化水解酪素产生 1ug 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{NP 活性 (U/g 鲜重)} = C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 15 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div W$$

2. 按照蛋白浓度计算

单位的定义：30℃ 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化水解酪素产生 1ug 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{NP 活性 (U/mg prot)} = C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 15 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div C_{\text{pr}}$$

3. 按照液体体积计算

单位的定义：30℃ 每 mL 样品在反应体系中每分钟催化水解酪素产生 1ug 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{NP 活性 (U/mL)} = C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 15 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}})$$

4. 按细菌或真菌细胞数量计算

单位的定义：30℃ 每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化水解酪素产生 1ug 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{NP 活性 (U/10}^4 \text{ cells)} = C_{\text{标}} \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.03 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}})$$

$C_{\text{标}}$ ：标准溶液浓度，50 μg/mL； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.06mL； W ：样本质量，g； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，10min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细菌或真菌细胞总数，500 万。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。

产品说明书

2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

- PMK1131 酸性蛋白酶检测试剂盒（微量法）
- PMK1133 碱性蛋白酶检测试剂盒（微量法）
- PMK1134 胰蛋白酶检测试剂盒（微量法）
- PMK1135 胃蛋白酶检测试剂盒（微量法）
- PMK1136 糜蛋白酶检测试剂盒/胰凝乳蛋白酶检测试剂盒（微量法）
- PMK1096 碱性磷酸酶（AKP/ALP）检测试剂盒（微量法）
- PMK1094 乙酰胆碱酯酶（AChE）检测试剂盒（微量法）



更多产品详情了解，请关注公众号：