

## 中性蛋白酶（Neutral protease, NP）活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50管/24样

**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，酪氨酸还原磷钨酸化合物生成钨蓝；在 680nm 有特征吸收峰。

### 自备仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪、1mL 玻璃比色皿、1.5 mL EP 管和蒸馏水。

### 试剂组成和配制：

试剂一：液体 90mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 10 mL 蒸馏水溶解。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加入 20 mL 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 50 mL 蒸馏水溶解。

试剂五：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

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

### 粗酶液提取：

1. 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。
2. 血清或培养液：直接测定。
3. 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。

### 测定操作：

1. 分光光度计预热 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℃ 水浴保温 30min。
3. **对照管**：取一支 EP 管，加入 100μL 粗酶液，200μL 试剂二，混匀后置于 30℃ 水浴保温 10min；加入 200μL 试剂三，混匀后 8000g，4℃ 离心 10min；取 200μL 上清液，加入新的 EP 管，再加入 1000μL 试剂四，200μL 试剂五，混匀后置于 30℃ 水浴保温 20min，于 680nm 测定光吸收，记为 A 对照管。
4. **测定管**：取一支 EP 管，加入 100μL 粗酶液，200μL 试剂三，混匀后置于 30℃ 水浴保温 10min；加入 200μL 试剂二，混匀后 8000g，4℃ 离心 10min；取 200μL 上清液，加入新的 EP 管，再加入 1000μL 试剂四，200μL 试剂五，混匀后置于 30℃ 水浴保温 20min，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 EP 管，加入 200μL 蒸馏水，1000μL 试剂四，200μL 试剂五，混匀后置于 30℃ 水浴保温 20min，于 680nm 测定光吸收，记为 A 空白管。
6. **标准管**：取 EP 管，加入 200μL 标准品，1000μL 试剂四，200μL 试剂五，混匀后置于 30℃

水浴保温 20min, 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 标准品 × (A 测定管 - A 对照管) ÷ (A 标准管 - A 空白管) × V 反总 ÷ (Cpr × V1) ÷ T = 125 × (A 测定管 - A 对照管) ÷ (A 标准管 - A 空白管) ÷ Cpr

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 标准品 × (A 测定管 - A 对照管) ÷ (A 标准管 - A 空白管) × V 反总 ÷ (W × V1 ÷ V2) ÷ T = 125 × (A 测定管 - A 对照管) ÷ (A 标准管 - A 空白管) ÷ 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 标准品 × (A 测定管 - A 对照管) ÷ (A 标准管 - A 空白管) × V 反总 ÷ V1 ÷ T = 125 × (A 测定管 - A 对照管) ÷ (A 标准管 - A 空白管)

4. 按照细胞数量计算

NP 活性单位定义: 30°C 每 10<sup>4</sup> 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 /10<sup>4</sup> cell) = C 标准品 × (A 测定管 - A 对照管) ÷ (A 标准管 - A 空白管) × V 反总 ÷ (细胞数量 × V1 ÷ V2) ÷ T = 125 × (A 测定管 - A 对照管) ÷ (A 标准管 - A 空白管) ÷ 细胞数量

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, 0.5mL; 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), 0.1 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。