# 中性蛋白酶（NPT）活性检测试剂盒说明书

规格：48 样　　方法：酶标仪法

## 一、注意事项

1. 使用前请通读一遍说明书再开始实验。
2. 正式检测前选取 2~3 个样本进行预检测。
3. 本试剂盒仅用于科研。
4. 临用前配制的试剂配制好后 4℃保存，并且 3 天内使用完毕。

## 二、产品组分

| 试剂名称 | 试剂规格 | 保存条件 | 备注 |
|---|---|---|---|
| 试剂一 | 60 mL×1 | 4℃ | |
| 试剂二 | 粉剂×1 | 4℃ | 临用前加 5 mL 蒸馏水溶解。 |
| 试剂三 | 粉剂×1 | 4℃避光 | 临用前加入 5 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 | 4℃ | 临用前加 22 mL 蒸馏水溶解。 |
| 试剂五 | 4.4 mL×1 | 4℃ | |
| 标准品 | 1 mL×1 | 4℃ | 0.25 μmol/mL 标准酪氨酸溶液。 |

## 三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水、研磨仪/研钵、冰、水浴锅。

## 四、样品制备

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 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一）进行冰浴匀浆，然后，8000 g，4℃，离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本。

2. 细菌/细胞：按照细菌/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 1 mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 200 w，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次）；然后 8000 g，4℃，离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本。

3. 液体样本：澄清的液体的样本直接测定，若浑浊则离心后取上清液检测。

**五、测定步骤**

1. 酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 680 nm 处。

2. 试剂二、试剂三和试剂四置于 30℃水浴保温 30 min。

3. 在 1.5 mL 离心管中依次加入：

| | 测定管 | 对照管 | 空白管 | 标准管 |
|---|---|---|---|---|
| 样本（μL） | 20 | 20 | - | - |
| 试剂二（μL） | - | 40 | - | - |
| 试剂三（μL） | 40 | - | | |
| 混匀后置于 30℃水浴保温 10 min。 | | | | |
| 试剂二（μL） | 40 | - | | |
| 试剂三（μL） | - | 40 | | |
| 混匀后 8000 g，4℃离心 10 min；在新的离心管中加入下列上清及试剂。 | | | | |
| 上清（μL） | 40 | 40 | - | - |
| 标准溶液（μL） | - | - | - | 40 |
| 蒸馏水/超纯水（μL） | - | - | 40 | - |
| 试剂四（μL） | 200 | 200 | 200 | 200 |
| 试剂五（μL） | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 充分混匀后置于 30℃水浴保温 20 min，吸取 200 μL 于 96 孔板中，于 680 nm 测定吸光度值，记 A 测定、A 对照、A 空白、A 标准，ΔA=（A 测定-A 对照）÷（A 标准-A 空白），每个测定管设置一个对照管，空白管和标准管只需要测定 2~3 次。 | | | | |

**六、计算**

1. 按照液体样本体积计算：

单位定义：30℃每毫升样品每分钟催化水解产生 1 nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

**中性蛋白酶（NPT）活性（nmol/min/mL）**=C 标准×$10^3$×ΔA×V 反总÷V1÷T=125×ΔA

2. 按照样本质量计算：

单位定义：30℃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。

**中性蛋白酶（NPT）活性（nmol/min/g 鲜重）**=C 标准×$10^3$×ΔA×V 反总÷（W×V1÷V2）

÷T=125×ΔA÷W

3. 按照蛋白质浓度计算（需另测蛋白浓度）：

单位定义：30℃每毫克蛋白每分钟水解产生 1 nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

**中性蛋白酶（NPT）活性（nmol/min/mg prot）**=C 标准×$10^3$×ΔA×V 反总÷（Cpr×V1）÷T=125×ΔA÷Cpr

4. 按细菌/细胞数量计算：

单位定义：30℃每 $10^4$ 个细胞每分钟催化水解产生 1 nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

**中性蛋白酶（NPT）活性（nmol/min/$10^4$ cell）**=C 标准×$10^3$×ΔA×V 反总÷（N×V1÷V2）÷T=125×ΔA÷N

C 标准：0.25 μmol/mL 标准酪氨酸溶液；$10^3$：μmol=$10^3$ nmol；V 反总：酶促反应总体积，0.1 mL；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），1 mL；T：催化反应时间（min），10 min；W：样品质量（g）；N：细菌/细胞数量；万个。

## 七、产品简介

中性蛋白酶是植物和微生物体内一类在中性 pH 条件下表现最佳活性的内肽酶。主要功能是催化蛋白质及多肽内部肽键的水解断裂，降解细胞内短寿命调节蛋白、老化和损伤蛋白以及胞外基质蛋白，是评价生物蛋白质代谢周转活性、发育调控能力及胁迫响应程度的重要酶学指标。