酸性蛋白酶（ACPT）活性检测试剂盒说明书

规格：96 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。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
试剂一	液体一：4 mL×1 液体二：2 mL×1	4℃	试剂一的配制：临用前按液体一：液体二：蒸馏水=90（μL）：20（μL）：21（mL）的比例配制，现配现用，如出现白色絮状沉淀则不能用。
试剂二	粉剂×2	4℃	临用前每瓶加 4 mL 蒸馏水溶解。
试剂三	粉剂×2	4℃避光	临用前每瓶加入 10 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，避免水分蒸发，一般加热 15-30 min，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×2	4℃	临用前每瓶加入 20 mL 蒸馏水溶解。
试剂五	8.5 mL×1	4℃	

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。8000 g，4℃离心 10 min，置于冰上，上清为待测液。

2. 细菌/细胞：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌/细胞加入 1 mL 试剂一），冰浴超声波破碎细菌/细胞（功率 300 w，超声 3 秒，间隔 7 s，总时间 3 min）；然后 8000 g，4℃，离心 10 min，置于冰上，上清为待测液。

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
粗酶液（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		

4. 在 1.5 mL 离心管中依次加入

	测定管	对照管	标准管	空白管
上清液（μL）	40	40	-	-
超纯水/蒸馏水（μL）	-	-	-	40
标准品（μL）	-	-	40	-
试剂四（μL）	20	20	20	20
试剂五（μL）	40	40	40	40
混匀后置于 30℃水浴保温 20 min，取 200 μL 于 96 孔板，于 680 nm 处测定光吸收，记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管、A 空白管，ΔA1=A 测定管-A 对照管，ΔA2=A 标准管-A 空白管。标准管和空白管仅做 2~3 次。				

六、计算

1. 按样本重量计算

酸性蛋白酶活性单位定义：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。

酸性蛋白酶活性（nmol/min/g 鲜重）=C 标准品×ΔA1÷ΔA2×V 反总÷（W×V1÷V 2）÷T=125×ΔA1÷ΔA2÷W

2. 按细菌/细胞数量计算

酸性蛋白酶活性单位定义：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。

酸性蛋白酶活性（nmol/min/10^4cell）=C 标准品×ΔA1÷ΔA2×V 反总÷（N×V1÷V2）÷T=125×ΔA1÷ΔA2÷N

3. 按样本体积计算

酸性蛋白酶活性单位定义：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。

酸性蛋白酶活性（nmol/min/mL）=C 标准品×ΔA1÷ΔA2×V 反总÷V1÷T=125×ΔA1÷ΔA2

4. 按样本蛋白浓度计算

酸性蛋白酶活性单位定义：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。

酸性蛋白酶活性（nmol/min/mg prot）=C 标准品×ΔA1÷ΔA2×V 反总÷（Cpr×V1÷V2）÷T=125×ΔA1÷ΔA2÷Cpr

C标准品：0.25 μmol/mL标准酪氨酸溶液；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：细胞/细菌总数，万个。

七、产品简介

酸性蛋白酶是植物和微生物体内一类在酸性条件下表现活性的天冬氨酸蛋白酶。主要功能是催化蛋白质及多肽链的内肽键水解，降解储存在液泡中的储藏蛋白及胞外老化和变性蛋白，在种子萌发期间储存蛋白的动员、叶片衰老过程中蛋白质回收、果实成熟软化及营养品质形成以及逆境（低温、干旱等）条件下蛋白质周转代谢中发挥重要作用，是评价植物蛋白质降解活性、氮素再利用效率及发育进程的重要酶学指标。