

中性蛋白酶（Neutral protease, NPT）试剂盒说明书

（微板法 48 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，中性蛋白酶（NPT）是在中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，进而得中性蛋白酶活性，

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×2 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×2 瓶	4°C保存	使用前甩几下或 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 12mL 提取液搅拌至溶解，最后再加提取液定容至 30mL,继续搅拌至全部溶解；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	使用前摇匀
试剂三	液体 50mL×1 瓶	4°C保存	使用前摇匀
试剂四	液体 40mL×1 瓶	4°C保存	使用前摇匀
试剂五	液体 10mL×1 棕色瓶	4°C保存	现用现配，使用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部，再加 20mL 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：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪、蒸馏水

四、中性蛋白酶（NPT）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；取上清液待测。

【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；取上清液待测。

【注】：若增加样本量，按细菌或细胞数量（10⁴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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 680nm，配制好的试剂一需预先 50°C水浴 10min。

② 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°C 离心 10min，上清液待用		

③ 显色反应：在 EP 管中依次加入：

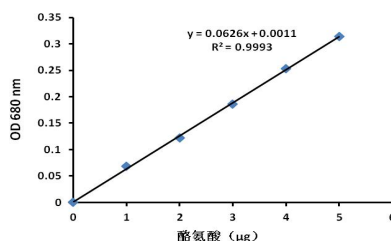
上清液	250	250
试剂四	375	375
试剂五	250	250
40°C 水浴 20min，取 200μL 澄清液（若浑浊，可 1500rpm 离心 10min）至 96 孔板中，于 680nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定管 - A 对照管。		

【注】1. 若 ΔA 在零附近徘徊，可以加大样本量（如增加到 0.2g），或延长 40°C 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 350μL，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： $y = 0.0626x + 0.0011$ ，x 是标准品质量（μg），y 是 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算：

活性单位定义：40°C 每毫克蛋白每分钟催化水解产生 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{NPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0011) \div 0.0626 \times (V3 \div V2) \div (Cpr \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 19.2 \times (\Delta A - 0.0011) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

3、按照样本质量计算：

活性单位定义：40°C 每克样品每分钟催化水解产生 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{NPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0011) \div 0.0626 \times (V3 \div V2) \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 19.2 \times (\Delta A - 0.0011) \div W \times D \end{aligned}$$

4、按照细胞数量计算：

活性单位定义：40°C 每 10^4 个细胞每分钟催化水解产生 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{NPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0011) \div 0.0626 \times (V3 \div V2) \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 19.2 \times (\Delta A - 0.0011) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

活性单位定义：40°C 每毫升液体样本每分钟催化水解产生 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{NPT 活性}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.0011) \div 0.0626 \times (V3 \div V2) \div V4 \div T \times D = 19.2 \times (\Delta A - 0.0011) \times D$$

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（100μg/mL）：标准品溶于 100mL 的 0.1mol/L 盐酸溶液中（两天内用完且-20°C 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度标准品：0, 4, 8, 12, 16, 20. μg/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。