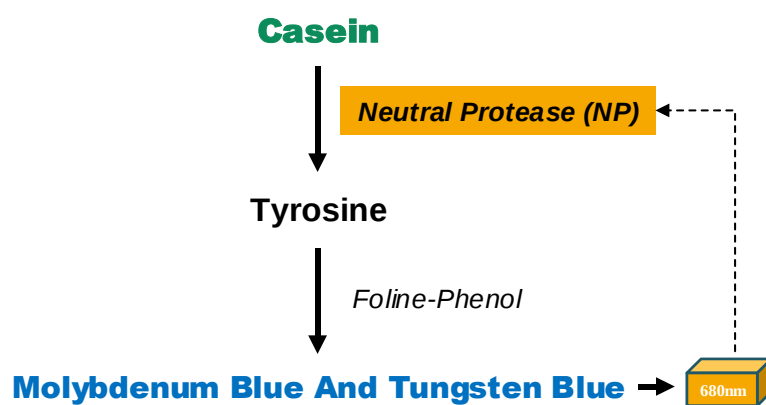




中性蛋白酶（NP）活性检测试剂盒
Neutral Protease (NP) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



中性蛋白酶（NP）活性检测试剂盒

Neutral Protease (NP) Activity Assay Kit

一、产品描述

中性蛋白酶（NP）是在中性环境下作用于蛋白质肽键的一类蛋白酶，可将蛋白质水解为氨基酸、多肽以及游离氨基酸。由于其安全无毒、水解能力强、作用范围广、反应条件温和等特点，在食品工业、乳制品加工、饲料、化妆品和营养保健品等领域具有广泛应用。

中性蛋白酶能够在中性条件下，催化酪蛋白水解产生酪氨酸，酪氨酸在碱性条件下能够还原磷钨酸化合物生成钨蓝，产物在 680 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征中性蛋白酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C 避光保存	使用前加 5 mL 蒸馏水充分溶解
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C 避光保存	使用前加 5 mL 提取液充分混匀 (沸水浴中溶解，密封以防止水分散失)
试剂三	液体 25 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂四	液体 5 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C 避光保存	25 μmol/mL 酪氨酸标准液
标准应用液的制备（现配现用）：将 25 μmol/mL 酪氨酸标准液使用蒸馏水稀释 100 倍至 0.25 μmol/mL 即为标准应用液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量(10^4 个)：提取液体积(mL) 为 (500-1000)：1 的比例（建议 500 万个细菌或细胞加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4°C 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：(5-10) 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清、培养液等液体样本：直接测定或使用提取液适当稀释后再进行测定。

2.测定步骤

①分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 680 nm，蒸馏水调零。

②使用前将试剂一、试剂二和试剂三 30℃预热 30 min。

③在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
粗酶液	20	20	-	-
试剂一	-	40	-	-
试剂二	40	-	-	-
充分混匀，30℃反应 10 min				
试剂一	40	-	-	-
试剂二	-	40	-	-
充分混匀，4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清				
上清液	40	40	-	-
标准应用液	-	-	40	-
蒸馏水	-	-	-	40
试剂三	200	200	200	200
试剂四	40	40	40	40
充分混匀，30℃反应 20 min				

吸光值测定：取 200 μL 反应液于微量玻璃比色皿/96 孔板中，测定 680 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。注：标准管和空白管只需测定 1-2 次，每个测定管均需设立一个对照管。

3.中性蛋白酶（NP）活性计算

①按组织质量计算

单位定义：30℃每 g 组织每分钟催化生成 1 μmol 酪氨酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{NP (U/g)} = \frac{C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{提}}}{\Delta A_{\text{标准}} \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{0.125 \times \Delta A_{\text{测定}}}{W \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

②按组织蛋白浓度计算

单位定义：30℃每 mg 组织蛋白每分钟催化生成 1 μmol 酪氨酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{NP (U/mg prot)} = \frac{\text{C 标准} \times \Delta\text{A 测定} \times \text{V 酶促}}{\Delta\text{A 标准} \times \text{Cpr} \times \text{V 样} \times \text{T}} = \frac{0.125 \times \Delta\text{A 测定}}{\text{Cpr} \times \Delta\text{A 标准}}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：30℃每 10⁴ 个细菌或细胞每分钟催化生成 1 μmol 酪氨酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{NP (U/10}^4\text{ cell)} = \frac{\text{C 标准} \times \Delta\text{A 测定} \times \text{V 酶促} \times \text{V 提}}{\Delta\text{A 标准} \times \text{细菌或细胞数量} \times \text{V 样} \times \text{T}} = \frac{0.125 \times \Delta\text{A 测定}}{\text{细菌或细胞数量} \times \Delta\text{A 标准}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：30℃每 mL 液体样本每分钟催化生成 1 μmol 酪氨酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{NP (U/mL)} = \frac{\text{C 标准} \times \Delta\text{A 测定} \times \text{V 酶促}}{\Delta\text{A 标准} \times \text{V 样} \times \text{T}} = \frac{0.125 \times \Delta\text{A 测定}}{\Delta\text{A 标准}}$$

注释： C 标准：酪氨酸标准应用液浓度，0.25 μmol/mL； V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL； V 提：粗酶液总体积，1 mL； V 酶促：酶促反应总体积，0.1 mL； Cpr：粗酶液蛋白浓度，mg/mL； W：样品质量，g； T：催化反应时间，10 min。

四、注意事项

- ①若ΔA 测定差值较小，可适当延长第一步反应时间（15-25 min），计算时相应修改；
- ②为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

