

总蛋白酶试剂盒说明书

(货号: BP10140W 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

蛋白酶活力通常利用天然底物和合成底物进行测定。各种蛋白酶均可水解天然底物酪蛋白因此由酪蛋白测得的活力是蛋白酶的总活力。

本试剂盒利用总蛋白酶催化水解偶氮酪蛋白, 生成的产物于366nm有光吸收, 通过测定吸光值的变化得出总蛋白酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 1 瓶	4°C避光保存	1. 临用前 8000g 4°C离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加 13mL 的蒸馏水混匀备用。
试剂二	液体 12mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 36mL×1 瓶	4°C保存	

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、天平、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【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 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

③ 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10^4): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min (等待仪器过自检程序亦可), 设定波长到 366nm。

② 所有试剂解冻至室温或于 25°C 水浴锅中孵育 20min。

③ 在 EP 管中按下表依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	120	120
试剂一	120	
试剂二	120	120
混匀，30°C 孵育 60min		
试剂三	360	360
试剂一		120
立即混匀，低温（放冰上）静置 5min；室温 12000rpm 离心 5min，直接取 200μL 至 96 孔板中，于 366nm 处读值。ΔA=A 测定-A 对照(每个样本做一个自身对照)。		

【注】：若 ΔA 在零附近徘徊，可以延长 30°C 孵育时间 T（如延长至 90min）或增加样本取样质量 W（如增至 0.2g），则改变后的反应时间 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

定义：每克组织每小时反应体系中变化 1 个吸收单位定义为 1 个偶氮酪蛋白单位。

$$\text{总蛋白酶(偶氮酪蛋白单位/h/g 鲜重)} = \Delta A \div 1 \div (W \times V1 \div V) \div T = 8.3 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算：

定义：每毫克组织蛋白每小时反应体系中变化 1 个吸收单位定义为 1 个偶氮酪蛋白单位。总蛋白酶(偶氮酪蛋白单位/h/mg prot) = $\Delta A \div 1 \div (V1 \times Cpr) \div T = 8.3 \times \Delta A \div Cpr$

3、按照液体体积计算：

定义：每毫升液体每小时反应体系中变化 1 个吸收单位定义为 1 个偶氮酪蛋白单位。

$$\text{总蛋白酶(偶氮酪蛋白单位/h/mL)} = \Delta A \div 1 \div V1 \div T = 8.3 \times \Delta A$$

4、按细菌/细胞数量计算：

定义：每 10⁴ 个细菌/细胞每小时反应体系中变化 1 个吸收单位为 1 个偶氮酪蛋白单位。

$$\text{总蛋白酶(偶氮酪蛋白单位/h/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div 1 \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.02 \times \Delta A \div Cpr$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.12mL；

W---样本质量，g；

T---反应时间，60min=1h；

500---细胞数量，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。