

# 中性蛋白酶测定试剂盒

## 微板法

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

# 使 用 说 明 书

货号：JL-T1367

有效期：6个月

规格：48T(20S)/96T(44S)

保存温度：2-8℃

## 实验原理：

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。本试剂盒检测组织和细胞样本时，如需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：JL-T0336）。

**检测范围：0.035-2.5U/mL      灵敏度：0.035U/mL**

## 注意事项：

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

**产品组成:**

试剂名称	规格 (48T/20S)	规格 (96T/44S)	保存条件
试剂一	60mL×1 瓶	120mL×1 瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃, 避光
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃, 避光
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃, 避光
试剂五	2mL×1 瓶	4mL×1 瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8℃, 避光

**所需仪器耗材及试剂:**

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、恒温箱、水浴锅、0.1mol/L HCL。

## 样本处理及要求：

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**，建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.035-2.5U/mL，如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩，样本的稀释液为蒸馏水。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。
3. **组织样本**：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 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一)冰浴匀浆，10000 g，4℃离心 10min，取上清待测。
4. **血清（浆）等液体样本**：直接测定，若浑浊，则离心后取上清液检测。
5. **细菌/细胞样本**：按照细菌或细胞数量 ( $10^4$ )：试剂一体积 (mL) 为 500~1000:1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；10000 g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

## 检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. 试剂二：临用前取一瓶加 5mL 蒸馏水溶解。
3. 试剂三：临用前取一瓶加入 5mL 试剂一，加热混匀溶解。（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）。
4. 试剂四：临用前取一瓶加入 10mL 蒸馏水溶解。
5. 试剂五：临用前加入蒸馏水稀释 3 倍，按需配制，现配现用。
6. **标准品溶液的配制:**加入 10mL 0.1mol/L HCL 溶解为 1000 $\mu$ g/mL 标准品母液，未使用完的建议-20 $^{\circ}$ C保存。取用溶解好的标准品母液 200 $\mu$ L 加 1800 $\mu$ L 水配置成 100 $\mu$ g/mL 标准品溶液，4 小时内使用完。下表用对应量的蒸馏水稀释成以下浓度的标准品工作液：0 $\mu$ g/mL、5 $\mu$ g/mL、10 $\mu$ g/mL、15 $\mu$ g/mL、20 $\mu$ g/mL、25 $\mu$ g/mL、30 $\mu$ g/mL、40 $\mu$ g/mL。（注：配制目标浓度的标准品工作液时，每次请根据表格从标准品母液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。）

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度 ( $\mu$ g/mL)	0	5	10	15	20	25	30	40
100 $\mu$ g/mL 标 准品( $\mu$ L)	0	50	100	150	200	250	300	400
蒸馏水( $\mu$ L)	1000	950	900	850	800	750	700	600

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准孔加样体系操作，依据结果  
咨询电话：400-0066-400

网址：[www.jonln.com](http://www.jonln.com)

即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用蒸馏水稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

## 操作步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 680nm。

2. 样本测定 (在 Ep 管中依次加入) :

试剂名称( $\mu\text{L}$ )	测定管	对照管	
样本	40	40	
试剂二		80	
试剂三	80		
混匀后置于 40°C 水浴保温 10min			
试剂二	80		
试剂三		80	
混匀后 8000 g, 4°C 离心 10min, 取上清待测			
取新的 1.5mL EP 管依次加入下列试剂			
试剂名称( $\mu\text{L}$ )	标准管	测定管	对照管
不同浓度标准品	80		
样本上清液		80	80
试剂四	120	120	120
试剂五	80	80	80
混匀后置于 40°C 水浴保温 20min			
取 200 $\mu\text{L}$ 澄清液 (若浑浊, 可 1500 g 离心 10min) 至 96 孔板中, 于 680nm 读取各孔 OD 值。			

注: 空白管和标准管只需要测定一次。

## 实验结果结算：

1. 标准品拟合曲线： $y=ax+b$ 。

2. 组织样本中总酚含量计算公式：

(1) 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  $1\mu\text{g}$  酪氨酸为 1 个酶活单位。

ACPT 活性( $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}$ )= $(\Delta A-b)\div a\div T\div C_{pr}\times N$

(2) 按照样本质量计算：

活性单位定义：40°C每毫克样品每分钟催化水解产生  $1\mu\text{g}$  酪氨酸为 1 个酶活单位。

ACPT 活性( $\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}$ )= $(\Delta A-b)\div a\div T\div W\times N$

(3) 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  $1\mu\text{g}$  酪氨酸为 1 个酶活单位。

ACPT 活性( $\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}$ )= $(\Delta A-b)\div a\div T\div 500\times N$

(4) 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  $1\mu\text{g}$  酪氨酸为 1 个酶活单位。

ACPT 活性( $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}$ )= $(\Delta A-b)\div a\div T\times N$

**注:**

y: 标准品 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

Cpr: 粗酶液蛋白质浓度, mg/mL

a: 标曲的斜率

T: 反应时间, 20min

x: 标准品的浓度

N: 样本的稀释倍数

b: 标曲的截距

W: 样本鲜重, g

$\Delta A$ : 测定孔 OD 值-对照孔 OD 值

500: 细胞数量, 万

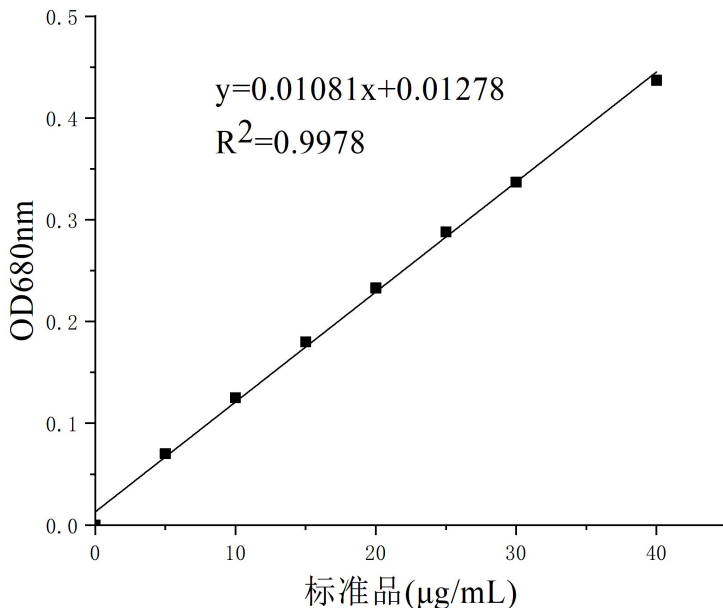
### 参考样本数据:

以下数据仅供参考:

样本类型	稀释倍数	参考值
菠萝肉 (10%匀浆)	不稀释	0.252U/mgprot
菠萝茎 (10%匀浆)	不稀释	0.229U/mgprot
小鼠肠 (10%匀浆)	5-10 倍稀释	0.023U/mgprot

### 参考曲线:

$y=0.01081x+0.01278$ ,  $R^2=0.9978$ ,  $x$  是标准品浓度( $\mu\text{g/mL}$ ),  $y$  是 $\Delta A$ 。



注意: 本图仅供参考, 应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。

**Note:**

**咨询电话：400-0066-400**

**传 真：021-55660885**

**电子邮箱：shjls@163.com**

**网 址：www.jonln.com**