

CheKine™ 酸性蛋白酶（ACP）活性检测试剂盒（微量法）

Cat #: KTB2270

Size: 48 T/24 S 96 T/48 S

	酸性蛋白酶（ACP）活性检测试剂盒（微量法）		
REF	货号：KTB2270	LOT	批号：见产品标签
	适用样本：动物组织、细菌和真菌、血清（浆）或其他液体		
	保质期：4℃，避光保存 6 个月		

原理

酸性蛋白酶（ACP）是一种在酸性环境下催化蛋白质水解的酶。该酶主要用于酒精发酵、啤酒酿造、毛皮软化、果酒澄清、酱油酿造、饲料等。CheKine™ 酸性蛋白酶（ACP）活性检测试剂盒（微量法）可检测动物组织、细菌和真菌、血清或血浆等生物样本。在该试剂盒中，酸性条件下，ACP 催化酪蛋白水解产生酪氨酸；在碱性条件下，酪氨酸还原磷钼酸化合物生成钨蓝；钨蓝在 680 nm 有特征吸收峰，通过测定其吸光度增加，来计算 ACP 活性。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Liquid I	1 mL	2 mL	4℃，避光保存
Liquid II	0.5 mL	1 mL	4℃，避光保存
Reagent II	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存
Reagent III	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存
Reagent IV	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃
Reagent V	2.4 mL	4.8 mL	4℃，避光保存
Standard	1 mL	1 mL	4℃，避光保存

注意：正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。

自备耗材

- 酶标仪或可见分光光度计（能测 680 nm 处的吸光度）
- 96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头、1.5 mL 离心管
- 水浴锅、低温离心机
- 去离子水
- 匀浆器或研钵（如果是组织样本）

试剂准备

Reagent I: 临用前配制；按 Liquid I：Liquid II：去离子水=90（μL）：20（μL）：21（mL）的比例配制，现配现用。出现白色絮状沉淀则不能用。

Working Reagent II: 临用前配制；48 T 加入 2.4 mL 去离子水，96 T 加入 4.8 mL 去离子水，充分溶解，用不完的试剂 4℃避光保存 3 天。

Working Reagent III: 临用前配制；48 T 加入 5 mL Reagent I，96 T 加入 10 mL Reagent I，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，避免水分全部蒸发，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），用不完的试剂 4℃避光保存 3 天。

Working Reagent IV: 临用前配制；48 T 加入 12 mL 去离子水，96 T 加入 24 mL 去离子水，充分溶解，用不完的试剂 4℃避光保存 3 天。

Reagent V: 即用型；使用前，平衡到室温。4℃避光保存。

注意：Reagent II 有刺激性气味，Reagent V 有毒，建议在通风橱进行实验。

Standard: 即用型；使用前，平衡到室温。4℃避光保存。

样本制备

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在-80℃下保存一个月。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 4 h 内完成样品解冻。

- 1. 动物组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Reagent I，冰浴匀浆，8,000 g，4℃离心 10 min，取上清，即粗酶液，置冰上待测。
- 2. 细菌和真菌：收集 500 万细菌或真菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细菌或真菌，离心后弃上清，加入 1 mL Reagent I，冰浴超声波破碎细菌或真菌 3 min（功率 30%或 300 W，超声 3 s，间隔 7 s），然后 8,000 g，4℃离心 10 min，取上清，即粗酶液，置冰上待测。
- 3. 血清（浆）等液体样本：直接检测。

注意：如需测定蛋白浓度，推荐使用 Abbkine 货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

- 1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 680 nm，可见光分光光度计用去离子水调零。
- 2. Reagent II、III、IV 于 30℃放置 30 min。
- 3. 操作表（下述操作在 1.5 mL 离心管中操作）：

试剂	空白管（μL）	标准管（μL）	测定管（μL）	对照管（μL）
样本	0	0	20	20
Working Reagent II			0	40
Working Reagent III			40	0
			混匀后置于 30℃孵育 10 min	
Working Reagent II			40	0
Working Reagent III			0	40
			混匀后 8,000 g，4℃离心 10 min，取上清	
上清液	0	0	40	40
Standard	0	40	0	0
去离子水	40	0	0	0



Working Reagent IV	200	200	200	200
Reagent V	40	40	40	40

混匀后置于 30℃孵育 20 min

4. 取 200 μL 至微量玻璃比色皿或 96 孔板中，记录 680 nm 处吸光值，空白孔记为 A_{空白}，标准孔记为 A_{标准}，测定孔记为 A_{测定}，对照孔记为 A_{对照}。计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。

注意：(1) 空白管和标准管只需做 1-2 次。实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。(2) 如果反应较弱， $\Delta A_{测定}$ 小于 0.002 可适当加大样本量，或延长反应时间 (20-30 min)，即第一步水浴时间，最后计算酶活时对公式进行修改。如果 $\Delta A_{测定}$ 大于 0.5，样本可用去离子水进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

注意：我们为您提供的计算公式，包括推导过程计算公式和简洁计算公式。两者完全相等。建议以加粗的简洁计算公式为最终计算公式。

ACP 活性的计算：

- (1) 按样本蛋白浓度计算：
酶活单位定义：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。
 $ACP(U/mg\ prot) = C_{标准品} \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times V_{反总} \div (Cpr \times V_{反}) \div T = 125 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div Cpr$
- (2) 按样本鲜重计算：
酶活单位定义：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。
 $ACP(U/g\ 鲜重) = C_{标准品} \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times V_{反总} \div (W \times V_{反} \div V_{提}) \div T = 125 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W$
- (3) 按照细菌或真菌数量计算
酶活单位定义：30℃每 10⁴ 个细菌或真菌每分钟催化水解产生 1 nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。
 $ACP(U/10^4\ 细菌或真菌) = C_{标准品} \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times V_{反总} \div (n \times V_{反} \div V_{提}) \div T = 125 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div n$
- (4) 按样本体积计算：
酶活单位定义：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。
 $ACP(U/mL) = C_{标准品} \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times V_{反总} \div V_{反} \div T = 125 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准}$

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；V_反：加入反应体系中粗酶液体积，0.04 mL；V_提：提取液总体积，1 mL；T：催化反应时间，10 min；W：样品质量，g；n：细菌或真菌数量。

结果展示

以下数据仅供参考，实验者需根据自己的实验对样品进行检测。

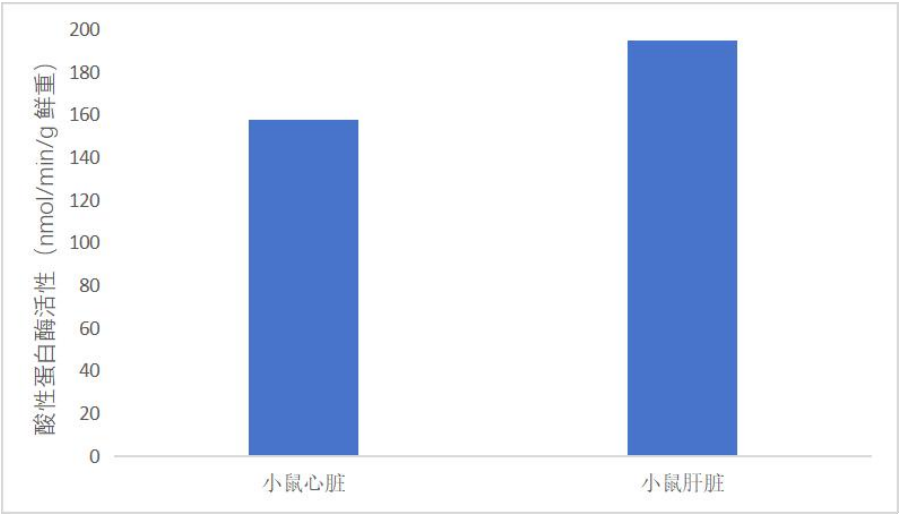


Figure 1. 本试剂盒测定小鼠心脏和小鼠肝脏中 ACP 的活性

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTB1030	CheKine™ 超氧化物歧化酶（SOD）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1040	CheKine™ 过氧化氢酶（CAT）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1110	CheKine™ 乳酸脱氢酶（LDH）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1640	CheKine™ 谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性检测试剂盒（微量法）

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

