

CheKine™ 碱性蛋白酶 (AKP) 活性检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB2280

规格: 48 T/24 S 96 T/48 S

批号: 见产品标签

	适用样本: 动物组织、血清 (浆) 或其他液体、细菌和真菌
	保质期: 4℃, 避光保存 6 个月

01 背景与原理

碱性蛋白酶 (AKP, EC 3.4.21.14) 是指在碱性条件下催化蛋白质肽键水解的酶类, 属于丝氨酸蛋白酶。此外, 该酶还能够水解酯键、酰胺键, 具有转酯及转肽的功能。该酶是主要工业用酶之一, 广泛应用于制药、丝绸、食品、制革等行业。

本试剂盒检测原理是在碱性条件下, AKP 水解酪蛋白生成酪氨酸, 酪氨酸还原磷钼酸生成钨蓝; 钨蓝在 680 nm 有特征吸收峰, 测定 680 nm 吸光度增加速率, 从而计算 AKP 活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	65 mL	65×2 mL	4℃
Reagent I	Powder×1 vial	Powder×1 vial	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℃
Reagent IV	3 mL	6 mL	4℃, 避光保存
Standard	1 mL	1 mL	4℃, 避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 680 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水	配制试剂/检测用
其他	匀浆器、低温离心机、恒温水浴锅、磁力搅拌器、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 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。
- 对于组织样本，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存；有毒且有刺激性气味，建议在通风橱进行实验
Working Reagent I	临用前配制；48 T 加入 3 mL 去离子水，96 T 加入 6 mL 去离子水，充分溶解	未用完的试剂 4℃避光保存 1 周；使用前根据实验用量取出部分试剂置于 40℃孵育 30 min
Working Reagent II	临用前配制；48 T 加入 5 mL Extraction Buffer，96 T 加入 10 mL Extraction Buffer，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）	未用完的试剂 4℃避光保存 1 周；使用前根据实验用量取出部分试剂置于 40℃孵育 30 min
Working Reagent III	临用前配制；48 T 加入 14 mL 去离子水，96 T 加入 28 mL 去离子水，充分溶解	未用完的试剂 4℃保存 1 个月；使用前根据实验用量取出部分试剂置于 40℃孵育 30 min
Reagent IV	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存
Standard	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存；0.25 μmol/mL 标准酪氨酸溶液

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取，如果不能当天提取，则把细（真）菌或者分装的组织块保存在-80℃，一个月内使用。当准备好进行该项实验时，将样本从-80℃拿出后，冰上解冻。但是请注意，这可能会影响样本的稳定性，实验结果可能会低于预期。

- **动物组织**：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer，进行冰浴匀浆，8000 g，4℃离心 10 min，取上清，置冰上待测。
- **细菌或真菌**：收集 5×10^6 细菌或真菌，用冷 PBS 清洗细菌或真菌，800 g 离心 2 min，弃上清液。加入 1 mL Extraction Buffer，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），8000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- **血清（浆）等液体样本**：直接检测。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 680 nm。
2. **检测体系配制**：在 1.5 mL EP 管中按照如下方式操作，空白管和标准管只需做 1-2 次，每个测定管均需设置一个对照管。

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 I	0	0	0	40
Working Reagent II	0	0	40	0
混匀后置于 40℃孵育 20 min				
Working Reagent I	0	0	40	0
Working Reagent II	0	0	0	40
混匀后 8000 g，4℃离心 10 min，取上清，在新的 EP 管中加入以下试剂				
上清液	0	0	40	40
Standard	0	40	0	0
去离子水	40	0	0	0
Working Reagent III	200	200	200	200
Reagent IV	40	40	40	40
混匀，置于 40℃孵育 20 min				

3. **吸光度检测**：取 200 μL 于 96 孔板中，记录 680 nm 处吸光值。空白管记为 $A_{\text{空白}}$ ，标准管记为 $A_{\text{标准}}$ ，测定管记为 $A_{\text{测定}}$ ，对照管记为 $A_{\text{对照}}$ 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)>进入“技术中心”>查找“在线



计算器”工具。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。

2. AKP 活力的计算：

● 按样本鲜重计算：

酶活单位定义：40℃ 每 g 样品每分钟催化水解产生 1 μmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{AKP(U/g)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.0625 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

● 按照细菌或真菌数量计算：

酶活单位定义：40℃ 每 10⁴ 个细菌或真菌每分钟催化水解产生 1 μmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{AKP(U/10}^4\text{)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{反应}} \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.0625 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N$$

● 按样本体积计算：

酶活单位定义：40℃ 每 mL 样本每分钟催化水解产生 1 μmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{AKP(U/mL)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样}} \div T = 0.0625 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$$

● 按样本蛋白浓度计算：

酶活单位定义：40℃ 每 mg 蛋白每分钟催化水解产生 1 μmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\text{AKP(U/mg prot)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{反应}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.0625 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

$C_{\text{标准}}$ ：0.25 μmol/mL 标准酪氨酸溶液； $V_{\text{反应}}$ ：酶促反应总体积，0.1 mL； C_{pr} ：粗酶液蛋白质浓度，mg/mL；

$V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中粗酶液体积，0.02 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入 Extraction Buffer 总体积，1 mL； T ：催化反应时间，20 min； W ：样品质量，g； N ：细菌或真菌数量，以 10⁴ 为单位（例如细胞数量为 5×10⁶， $N=500$ ）。

07 结果展示

示例-1: 取 0.315 g 小鼠胃，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 1.287 - 0.874 = 0.413$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.327 - 0.045 = 0.282$ ，按样本鲜重计算得：AKP(U/g)= $0.0625 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 0.291$ U/g。

08 FAQ

● 检测得到的样本 ΔA 过高或者过低怎么办？

如果样本的 $\Delta A_{\text{测定}} > 1.0$ ，样本需用 Extraction Buffer 适当稀释，再重新测定，或减少提取用样本量。如果样本的 $\Delta A_{\text{测定}} < 0.01$ ，可适当延长反应时间，即第一步水浴时间，最后计算酶活时对公式进行修改，或适当提高样本量。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1015	CheKine™ α-葡萄糖苷酶活性检测试剂盒（微量法）
KTB1121	CheKine™ 丙酮酸（PA）含量检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 碱性蛋白酶（AKP）活性检测流程示意图

(Abbkin 货号：KTB2280)

