CheKine™ 酸性蛋白酶（ACP）活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB2270　　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、细菌和真菌、血清（浆）或其他液体
	保质期：4℃，避光保存 6 个月

01 背景与原理

酸性蛋白酶（Acid Protease，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。

本试剂盒检测原理是 ACP 在酸性条件下（pH 2.5~4.0）催化蛋白质（酪蛋白）水解，产生含酚基的氨基酸（如酪氨酸）。酪氨酸在碱性条件下还原福林酚（磷钼酸-磷钨酸混合试剂）生成蓝色复合物（钼蓝与钨蓝混合物），该蓝色复合物在 680 nm 处有最大吸收峰。通过测定吸光度的增加速率，即可计算 ACP 的活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	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

***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	PBS、去离子水	样本清洗/检测试剂配制用
其他	匀浆器（组织样本）、超声破碎仪（细胞或细菌）、水浴锅、低温离心机、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。**
- 对于组织样本及细胞样本等，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

试剂名称	试剂准备	注意事项
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	未用完的试剂 4℃避光保存 3 天；**Working Reagent Ⅱ有刺激性气味，建议在通风橱进行实验**
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）	未用完的试剂 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	未用完的试剂 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；**Reagent V 有毒，建议在通风橱进行实验**
Stardard	即用型；使用前平衡到室温	0.25 μmol/mL 标准品液；4℃避光保存

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，则把完整细菌、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 Reagent Ⅰ，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 个细菌或真菌，用预冷的 PBS 清洗细菌或真菌，800 g 离心 2 min，弃上清。加入 1 mL Reagent Ⅰ进行冰浴超声破碎。超声波破碎 3 min（功率 30%或 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），4℃，8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。
- **血清（浆）等液体样本**：直接测定。

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. Working Reagent Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ于 30℃放置 30 min。
3. **检测体系配制**：空白管和标准管只需做 1 次。在 1.5 mL 离心管中按照如下方式操作：

试剂	测定管（μL）	对照管（μL）	空白管（μL）	标准管（μL）
样本	20	20	0	0
Working Reagent Ⅱ	0	40	0	0
Working Reagent Ⅲ	40	0	0	0
混匀后置于 30℃孵育 10 min				
Working Reagent Ⅱ	40	0	0	0
Working Reagent Ⅲ	0	40	0	0
混匀后 8000 g，4℃离心 10 min，取上清				
上清液	40	40	0	0
Standard	0	0	0	40
去离子水	0	0	40	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. **吸光度检测**：取 200 μL 至 96 孔板中，测定 680 nm 处吸光值，分别记录为 $A_{测定}$、$A_{对照}$、$A_{空白}$、$A_{标准}$。

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**] > 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$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$。

2. 样本 ACP 活性计算

- 按样本质量计算

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。

$ACP\ (U/g)=C_{标准品}\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\times V_{反总}\times10^3\div(W\times V_{样}\div V_{提})\div T=\mathbf{125\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\div W}$

- 按细菌或真菌数量计算:

酶活单位定义：30℃每 10^4 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。

$ACP\ (U/10^4)=C_{标准品}\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\times V_{反总}\times10^3\div(N\times V_{样}\div V_{提})\div T=\mathbf{125\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\div N}$

- 按液体体积计算

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。

$ACP\ (U/mL)=C_{标准品}\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\times V_{反总}\times10^3\div V_{样}\div T=\mathbf{125\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}}$

- 按蛋白浓度计算

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。

$ACP(U/mg\ prot)=C_{标准品}\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\times V_{反总}\times10^3\div(Cpr\times V_{样})\div T=\mathbf{125\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\div Cpr}$

$C_{标准品}$: 0.25 μmol/mL 标准酪氨酸溶液；$V_{反总}$: 酶促反应总体积，0.1 mL；10^3: 单位换算系数，1 μmol=1000 nmol；Cpr：粗酶液蛋白质浓度，mg/mL；$V_{样}$：加入反应体系中粗酶液体积，0.02 mL；$V_{提}$：加入 Reagent Ⅰ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，以 10^4 为单位（例如细菌数量为 5×10^6，N=500）。

07 结果展示

示例-1：取 0.11 g 小鼠肝脏，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=0.241-0.190=0.051$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}=0.295-0.046=0.249$。按样本质量计算得：$ACP\ (U/g)=125\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\div W=232.749$ U/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本$\Delta A_{测定}$过高或者过低怎么办?**

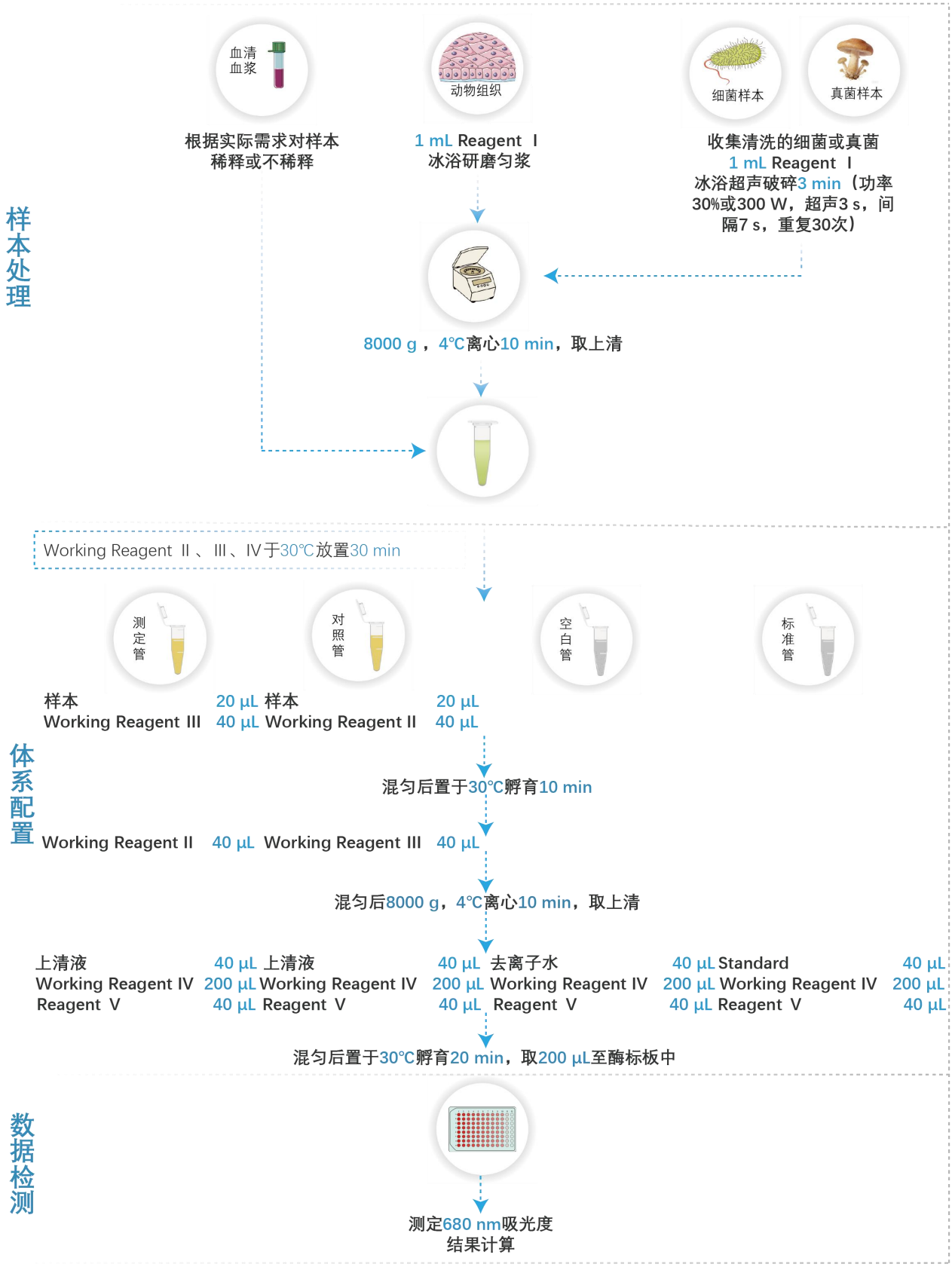
如果反应较弱，$\Delta A_{测定}$小于 0.002 可适当加大样本量，或延长反应时间（20-30 min），即第一步水浴时间，最后计算酶活时对公式进行修改。如果$\Delta A_{测定}$大于 0.5，样本可用去离子水进一步稀释，或减少提取用样本量，再重新进行测定。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
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）

CheKine™ 酸性蛋白酶（ACP）活性检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB2270）



V1.0