

酸性蛋白酶（ACP）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC10416

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 35 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 10mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 50 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 10 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂五	液体 15 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 10 mL 试剂五，沸水浴中搅拌溶解；
- 2、标准品：20 μ mol/mL 标准酪氨酸。

产品说明：

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。

酸性条件下，ACP 催化酪蛋白水解产生酪氨酸；在碱性条件下，酪氨酸还原磷钨酸化合物生成钨蓝；钨蓝在 680nm 有特征吸收峰，通过测定其吸光度增加，来计算 ACP 活性。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

研钵/匀浆器、台式离心机、可见分光光度计、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪、1mL 玻璃比色皿、1.5 mL EP 管、冰、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

称约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，冰上充分研磨，10000rpm 4°C 离心 10min，取上清，即粗酶液，置冰上待测。或直接称取 0.1g 酶制品，加入 1mL 提取液，置冰上待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 680nm，蒸馏水调零。
- 2、试剂一、试剂二和试剂三置于 30°C 水浴保温 30min 以上。
- 3、标准溶液的配制：临用前将 20 μ mol/mL 标准液用蒸馏水稀释 80 倍至 0.25 μ mol/mL 标准溶液使用，现用现配。

4、样本测定（1.5mLEP管中分别加入下列试剂）

试剂名称（ μL ）	对照管	测定管	空白管	标准管
粗酶液	100	100		
提取液	100	100		
试剂一	200			
试剂二		100		
混匀后30°C水浴保温10min				
试剂一		200		
试剂二	100			
混匀后10000rpm 4°C离心10min，取上清				
上清	200	200		
蒸馏水			200	
标准品				200
试剂三	1000	1000	1000	1000
试剂四	200	200	200	200
混匀后30°C水浴保温20min				

取1mL于1mL玻璃比色皿中，于680nm测定光吸收，分别记为A对照管、A测定管、A空白管、A标准管。

三、ACP活性计算

1、按样本蛋白浓度计算

酶活单位定义：30°C每毫克蛋白每分钟催化水解产生 $1\mu\text{mol}$ 酪氨酸为一个酶活单位。

$$\text{ACP 酶活 (U/mg prot)} = \text{C 标准品} \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times \text{V1} \div (\text{Cpr} \times \text{V2}) \div \text{T}$$

$$= 0.125 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算

酶活单位定义：30°C每克样本每分钟催化水解产生 $1\mu\text{mol}$ 酪氨酸为一个酶活单位。

$$\text{ACP 酶活 (U/g 质量)} = \text{C 标准品} \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times \text{V1} \div (\text{W} \times \text{V2} \div \text{V3}) \div \text{T}$$

$$= 0.125 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{W}$$

C 标准品：0.25 $\mu\text{mol/mL}$ 标准酪氨酸溶液； Cpr：粗酶液蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g； V1：酶促反应总体积，0.5mL； V2：加入反应体系中粗酶液体积，0.1mL； V3：粗酶液总体积，1mL； T：催化反应时间，10min。

注意事项：

若反应较弱，即（A测定管-A对照管）差值较小，可适当延长反应时间（20-30min），即第一步水浴时间，最后计算酶活时对公式进行修改。

实验实例：

1、取 0.1g 小鼠肝脏加入 1mL 提取液冰上充分研磨，10000rpm 4°C离心 10min，取上清，置冰上，之后按照测定步骤操作，测得计算 A 测定管=0.537，A 对照管=0.481，A 标准管=0.39，A 空白管=0.005，按样本质量计算酶活得：

$$\text{ACP 活性 (U/g 质量)} = 0.125 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{W} = 0.182 \text{ U/g 质量。}$$

相关发表文献:

[1] Xin-Bin, Gu, Xin, et al. Hematopoietic Substrate-1-Associated Protein X-1 Regulates the Proliferation and Apoptosis of Endothelial Progenitor Cells Through Akt Pathway Modulation[J]. Stem Cells, 2017. (IF 5.614)

[2] Shijun Wang, Yunfei Cao, Zuqing Yang, et al. MicroRNA-93-5p increases multidrug resistance in human colorectal carcinoma cells by downregulating cyclin dependent kinase inhibitor 1A gene expression. Oncology Letters. December 2016. (IF 1.874)

相关系列产品:

AC10418/AC10419 中性蛋白酶 (NP) 活性检测试剂盒

AC10420/AC10421 碱性蛋白酶 (AKP) 活性检测试剂盒