植物酸性蛋白酶(ACPr)检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHB1-M48	酸性蛋白酶(ACPr)试剂盒	48T	微量法
PMHB1-M96		96T	

一、 测定意义：

ACPr 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。

二、 测定原理：

酸性条件下，ACPr 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 680nm 有特征吸收峰，通过测定其吸光度增加，来计算 ACPr 活性。

三、 试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体60mL×1瓶	液体110mL×1瓶	2-8℃保存
试剂一	液体8mL×1瓶	液体15mL×1瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1瓶	粉剂×2瓶	2-8℃保存
试剂二的配制：每瓶粉剂加入5mL试剂一，沸水浴搅拌充分溶解后待用.			
试剂三	液体5mL×1瓶	液体10mL×1瓶	2-8℃保存
试剂四	液体18mL×1瓶	液体35mL×1瓶	2-8℃保存
试剂五	液体5mL×1瓶	液体10mL×1瓶	2-8℃保存
标准品(10μmol/mL)	1.5mL×1支	1.5mL×1支	2-8℃保存

四、 操作步骤：

样本前处理

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5～10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g ，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 680nm，蒸馏水调零。

2、标准品溶液稀释：取适量标准品用蒸馏水稀释至 0、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5μmol/mL，制作标准曲线。

3、操作表：

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
样本（μL）	20	20		
试剂一（μL）	20	20		
试剂二（μL）	40	-		
混匀，37℃孵育10min			-	
试剂三（μL）	40	40		
试剂二（μL）	-	40		
混匀，10000转/min常温离心10min，取上清液备用。				
上清液（μL）	40	40	-	-
标准液（μL）	-	-	40	-
蒸馏水（μL）	-	-	-	40
试剂四（μL）	150	150	150	150
试剂五（μL）	40	40	40	40
混匀后 37℃保温20min，10000rpm室温离心10min，取上清液于波长680nm，蒸馏水调零，测定各管吸光度值。分别记为 $A_{测定}$、$A_{对照}$、$A_{标准}$、$A_{空白}$。计算 $\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$。每个测定管需设一个对照，标准和空白只需要测一次。				

五、酸性蛋白酶（ACPr）活性计算：

1、标准曲线绘制：以吸光度值为横坐标，标准品浓度为纵坐标，绘制标准曲线 y =kx+ b，x 为吸光度值，y 为标准品浓度浓度（μmol/mL）。根据标准曲线，将ΔA 带入公式计算出样本浓度（y，μmol/mL）；

2、按样本质量计算：

单位定义：每克组织在反应体系每分钟催化水解 1μmol 酪素为 1 个酶活单位。

计算公式：ACPr（U/g）= y×$V_{\text{反总}}$÷(W×$V_{\text{样}}$÷$V_{\text{样总}}$)÷T=0.6 ×y÷W

3、按蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白在反应体系中每分钟催化水解 1μmol 酪素为 1 个酶活单位。

计算公式：ACPr（U/mg prot）=y×$V_{\text{反总}}$÷（Cpr×$V_{\text{样}}$）÷T=0.6 ×y÷Cpr

$V_{\text{反总}}$：反应体系总体积，0.12mL；$V_{\text{样}}$：加入样本体积，0.02mL；$V_{\text{样总}}$：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，10 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量 g。

六、注意事项：

1、比色时，溶液呈现蓝色，在 1h 内保持稳定；

2、不同样本的酸性蛋白酶差异较大，先做预实验确认样本稀释倍数。如果ΔA 测小于 0.005 可适当加大样本量。如果 A 测大于 0.3，样本可用去离子水进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。

3、不同仪器测定出来的吸光度值存在差异，实验时需同时测定标准曲线。

【厂家信息】

生产企业：南京陌凡生物科技有限公司
地址：南京市栖霞区红枫科技园 A6 栋 2 层

【售后微信】

【说明书核准及修改日期】

核准日期：2025 年 4 月 7 日
修改日期：2025 年 4 月 7 日