

Seebio[®]蛋白酶 K (Proteinase K) 活性测定试剂盒 (Folin 法) 说明书

【产品名称】

Seebio[®]蛋白酶 K (Proteinase K) 活性测定试剂盒 (Folin 法)

【产品编码】

DDM1929A

【包装规格】

| 货号 | 序号 | 名称组份及包装规格 |
|------------------|----|---------------------------------------|
| DDM192 9A-96T | 1 | 标准液 (100 μ g/ml) : 1 \times 1ml |
| | 2 | 10 \times 反应液: 1 \times 10ml |
| | 3 | 底物 (粉剂) : 1 \times 1 瓶 |
| | 4 | 沉淀剂 (粉剂) : 1 \times 1 瓶 |
| | 5 | 显色液 A (粉剂) : 1 \times 1 瓶 |
| | 6 | 显色液 B: 1 \times 4ml |
| | 7 | 96 孔微孔板: 1 块 |
| | 8 | 助溶剂: 1 \times 0.5ml |

【检测原理和用途】

蛋白酶 K 在适宜的温度及 pH 条件下能够高效地催化水解蛋白质, 它具有酶活性高、稳定性较好等特性, 因此在多个领域有着广泛的应用。在生物技术领域, 常用于核酸提取过程中蛋白质的去除, 可有效提高核酸的纯度与质量; 在皮革工业中, 有助于皮革的鞣制前期处理, 使皮革更加柔软、细腻; 在医药研发方面, 可用于蛋白质组学研究中蛋白质样品的预处理等。

中性条件下, 蛋白酶 K 催化血红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; 在 680nm 有特征吸收峰。

【酶活定义】

在 57 $^{\circ}$ C、pH8.0 条件下, 1min 内水解牛血红蛋白产生 1 μ mol 酚基氨基酸所需的酶量, 定义为 1 个酶活单位。

【使用说明】

一、试剂盒用前准备

1. 请事先准备好酶标仪、无菌离心管、水浴锅、磁力搅拌器、微量移液器和纯水等。

2. 10 \times 反应液用无菌水按 1:10 稀释至 1 \times , 4 $^{\circ}$ C 存放;
3. 底物 (粉剂) 加 10ml 反应液及 0.2ml 的助溶剂, 瓶盖勿拧紧, 于 95 $^{\circ}$ C 水浴 20min, 每 5min 震荡混匀 1 次, 冷却至室温备用。于 4 $^{\circ}$ C 存放不超过 3 天, -20 $^{\circ}$ C 可长期保存。
4. 沉淀剂 (粉剂) 加 10ml 纯水, 室温震荡溶解。
5. 显色液 A (粉剂) 加 20ml 纯水, 室温震荡溶解。

二、样品制备

1. 组织样品

按照组织质量(g):反应液(ml)=1:5~10 的比例混合, 冰浴匀浆后, 4 $^{\circ}$ C, 8000g 离心 10min, 取上清, 得粗酶液, 冰浴待测。

2. 血清或培养液

直接作为粗酶液进行测定。

3. 细菌、真菌样品

按照 5 \times 10⁶ 个细胞加 1ml 反应液的比例重悬细胞, 冰浴超声波破碎细胞 (300w, 3s/7s, 3min); 然后于 4 $^{\circ}$ C, 8000g 离心 10min, 取上清, 得粗酶液, 冰浴待测。

三、检测步骤

1. 酶标仪开机预热 30min, 调节检测波长至 680nm。

2. 标准曲线绘制

(1) 用反应液稀释 100 μ g/ml 的酪氨酸标准液, 成 0、10、20、30、40、50、60 μ g/ml 的标准工作溶液。

(2) 分别取 40 μ l 各浓度的标准工作液, 加入对应 EP 管内, 在每管中加入 200 μ l 显色液 A 和 40 μ l 显色液 B, 混匀, 40 $^{\circ}$ C 水浴 20min。

(3) 将各标准反应液加入 96 孔板, 200 μ l/孔, 测定 680nm 光吸收值。以 L-酪氨酸含量为 x 轴, 对应吸光度值为 y 轴, 绘制标准曲线, $r^2 \geq 0.9900$ 。

3. 样品测定

(1) 分别量取 40 μ l 纯水 (对照组)、40 μ l 粗酶液 (检测组) 置于 EP 管中, 于 57 $^{\circ}$ C 水浴 5min。配置好的底物液同时同样处理;

(2) 在对照组和检测组试管中分别加入 40 μ l 底物液, 混匀, 57 $^{\circ}$ C 水浴 10min;

(3) 各管加入 80 μ l 沉淀剂, 混匀, 57 $^{\circ}$ C 水浴 10min;
然后 12000g 离心 5min, 取 40 μ l 上清液加入新的 EP 管
内;

(4) 再加入 200 μ l 显色液 A 和 40 μ l 显色液 B, 混匀,
40 $^{\circ}$ C 水浴 20min, 取 200 μ l 加入 96 孔板内, 测定 680nm
的光吸收值。

4. 结果计算

(1) 检查并确定样品的 680nm 光吸收值位于标准曲线
的检测区间内, 如果高出或低于这一区间, 应对样品进
行稀释或浓缩, 直至检测值位于标准区间之内;

(2) 根据标准方程计算出样品中的酪氨酸浓度 C
(μ g/ml);

(3) 样品中蛋白酶 K 的活力以 X_i 表示, 按以下公式计
算:

$$X_i = \frac{(C - C_0) \times N \times 0.16}{M \times 10 \times 0.04}$$

式中:

X_i — 酶活浓度 (U/ml);

C — 样品管的酪氨酸浓度 (μ g/ml);

C_0 — 空白管的酪氨酸浓度 (μ g/ml);

N — 稀释或浓缩倍数;

M — L-酪氨酸的摩尔质量 (181.20g/mol);

0.16 — 酶反应体系总体积, 单位为毫升 (mL);

0.04 — 参与反应酶样品体积, 单位为 ml;

10 — 反应时间 (min)。

【储存条件和有效期】

2-8 $^{\circ}$ C 储存, 有效期 12 个月。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅供科研用途, 不得用于临床诊断;
2. 适当延长酶液和底物的反应时间会提高检测的灵敏度, 计算时要做相应修改;
3. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套作。

【技术支持服务】

您若有疑问或反馈, 请联系:

Tel: 021-50272981*6217 或 Email: market@seebio.cn

西宝生物二维码

