

糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶 (Chymotrypsin) 试剂盒说明书

(货号: G1211F 分光法 24 样)

一、产品简介:

糜蛋白酶 (EC 3.4.21.1) 又称胰凝乳蛋白酶, 是胰腺分泌的一种蛋白水解酶, 具有肽链内切酶的作用, 通过切断蛋白质肽链中酪氨酸、苯丙氨酸的羧端肽链作用, 专一水解羧端芳香族氨基酸。临床上糜蛋白酶用于痰液稀化, 对脓性和非脓性痰液均有效; 也用于创伤或手术后伤口愈合。

糜蛋白酶可催化酪蛋白水解生成含酚的氨基酸, 含酚的氨基酸与福林酚反应后显蓝色; 其颜色的深浅与胃蛋白酶活性呈正比。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前加 2.8mL 的试剂四, 再加 5.6mL 的试剂二沸水加热, 涡旋振荡 (反复几次) 直到全部溶解, 再加 24mL 的试剂二混匀, 配置完的试剂 4℃ 保存, 三天内用完。
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 5mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 8mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	液体 10mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	液体 2mL×1 支	4℃ 保存	
质控品	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	若用该试剂, 则用前加 1mL 蒸馏水溶解, 再用蒸馏水稀释 10 倍, 即 0.1mg/mL 的糜蛋白酶。

三、所需的主要仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、天平

四、糜蛋白酶活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4℃×4000rpm 离心 5min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

② 液体样本: 液体用提取液按照 1:1 的比例混合稀释后, 4℃×4000rpm, 离心 5min, 取上清液检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 680nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温。

③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	500	
试剂三		100
37°C 孵育 10min		
试剂三	100	
试剂一		500
37°C 孵育 10min, 4000rpm 室温离心 10min, 上清液待测		

④ 显色反应，在 EP 管中：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管 (只做一次)	空白管 (只做一次)
上清液	200	200		
标准品			200	
提取液				200
蒸馏水	200	200	200	200
试剂四	100	100	100	100
试剂五	200	200	200	200
37°C 孵育 20min 后 (若浑浊则室温 4000rpm 离心 5min)，全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 680nm 处读取各管的吸光值 A。ΔA=A 测定-A 对照。				

【注】 1. 若 ΔA 在零附近徘徊，可以延长反应时间 T (如 37°C 孵育 10min 延长至 20min) 或增加样本量 V1 (如增至 200μL，则试剂一相应减少)，则改变后的反应时间 T 和样本量 V1 需代入计算公式重新计算。

2. 若 A 测定值大于 1.5，可以减少样本量 V1 (如减至 50μL，用提取液相应补充)，则改变后的样本量 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：37°C 每毫克蛋白每分钟催化酪蛋白水解生成 1μg 氨基酸为 1 个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{糜蛋白酶 (U/mg prot)} &= [\Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times C \text{ 标准} \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 35 \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div Cpr \end{aligned}$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：37°C 每 g 组织每分钟催化酪蛋白水解生成 1μg 氨基酸为 1 个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{糜蛋白酶 (U/g 鲜重)} &= [\Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times C \text{ 标准} \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 35 \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \end{aligned}$$

3、液体中酶活力的计算：

酶活定义：37°C 每毫升液体每分钟催化酪蛋白水解生成 1μg 氨基酸为 1 个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{糜蛋白酶 (U/mL)} &= [\Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times C \text{ 标准} \times V2] \div V1 \div T \\ &= 35 \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.1mL；

V2---第③步反应总体积，0.7mL；

T---反应时间，10min；

C 标准---50μg/mL；

W---样本质量，g；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒