

糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶 (Chymotrypsin) 试剂盒说明书

(货号: G1211W 微板法 96 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。

本试剂盒采用糜蛋白酶催化水解 N-琥珀酰-丙酰氨-丙酰氨-脯酰氨-苯丙氨酸对硝基酰苯胺 (SAAPFpNA) 生成对硝基苯胺, 后者在 405nm 有最大吸收峰, 通过测定吸光值升高速率即可得出糜蛋白酶的活性大小。

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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 17mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	-20℃保存	若凝固则可于 37℃水浴至融化。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的主要仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、天平、水浴锅、研钵、冰和蒸馏水。

四、糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶活性测定:

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℃×12000rpm 离心 5min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若第一次离心后样本上清液仍比较浑浊, 可把上清液转移至新 EP 管中再次于 4℃×12000rpm 离心 10min 后, 取上清液测定。(若是含脂类比较高的样本, 可把二次离心后的上清液置于低温 (4 度冰箱) 中静置 15-30min 左右, 使脂类物质凝固于液体表面, 弃掉上层固体, 取中间的较澄清的液体检测。)

【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: 若是澄清液体, 直接检测, 若液体样本浑浊, 需 4℃×12000rpm, 离心 10min, 取上清液检测。

2、上机检测:

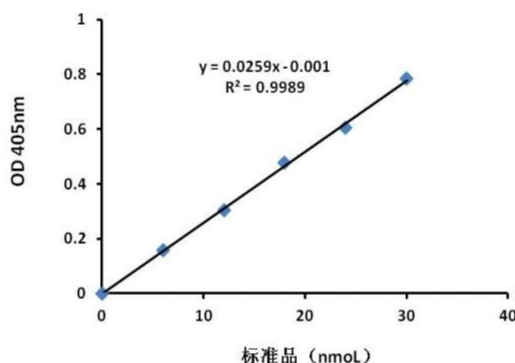
- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。
- ② 所有试剂解冻至 37℃或于 37℃水浴锅中孵育 15-30min。
- ③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	30
试剂一	160
试剂二	10
混匀，立即于 405nm 处测定吸光值 A1，37°C 条件下反应 5min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【注】1. 若 ΔA 小于 0.01，可以延长反应时间 T（如延长至 10min 后读取 A2）或增加样本量 V1（如增至 60μL，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 ΔA 大于 0.5，可缩短反应时间 T（如缩至 2min 后读取 A2）或减少样本量 V1（如减至 10μL，则试剂一相应增加），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。

五、结果计算：

- 1、标准曲线： $y = 0.0259x - 0.001$ ：x 为标准品(nmoL)，y 为 ΔA 。



- 2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

$$\text{糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶(nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.001) \div 0.0259] \div (W \times V1 \div V) \div T = 257.4 \times (\Delta A + 0.001) \div W$$

- 3、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

$$\text{糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶(nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.001) \div 0.0259] \div (V1 \times Cpr) \div T = 257.4 \times (\Delta A + 0.001) \div Cpr$$

- 4、按照液体体积计算：

单位定义：每毫升液体每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶(nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.001) \div 0.0259] \div V1 \div T = 257.4 \times (\Delta A + 0.001)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.03 mL；

W---样本质量，g；

T---反应时间，5min；

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；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (50μmol/mL)：临用前甩几下或离心，使粉体落入底部，加入 0.5mL 乙醇，涡旋震荡溶解后再加入 0.5mL 的蒸馏水混匀，得到 50μmol/mL 备用。
- 2 用蒸馏水把母液稀释成以下浓度：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1μmol/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 3 30μL 标准品+170μL 试剂一，混匀后于 405nm 处读取 A 值，依据结果即可制作标准曲线。