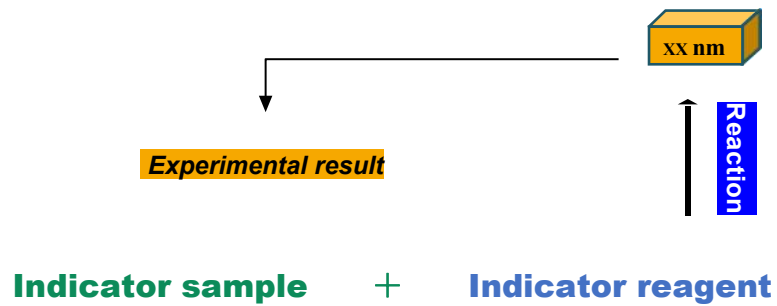


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

糜蛋白酶活性检测试剂盒说明书 紫外分光光度法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

产品说明：

糜蛋白酶，又称胰凝乳蛋白酶，是胰腺分泌的一种蛋白水解酶，能迅速分解变性蛋白质。糜蛋白酶的功能与胰蛋白酶相似，但是具有分解能力强、毒性低和不良反应小等优点。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，如白内障摘除。

糜蛋白酶催化 BTEE 水解，产物在 256nm 有特征光吸收；通过测定 256nm 光吸收增加速率，来计算糜蛋白酶活性。

自备仪器和用品：

紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、移液器、1mL 石英比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前溶于 4mL 甲醇中，再用水定容至 25mL。可分装后-20保存，避免反复冻融。
试剂三	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	

操作步骤：

一、粗酶液提取

a. 组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 1：5-10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心 10min，取上清即粗酶液。

b. 血清（浆）：直接检测。

二、测定操作：

(1) 紫外分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 256nm，蒸馏水调零。

(2) 试剂一置于 25℃水浴中保温 30min。

(3) 操作表:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	450
试剂二	450
试剂三	100
样品	100

将上述试剂分别加入 1mL 石英比色皿后充分混匀, 于 256nm 处测定初始吸光值 A1, 然后迅速将比色皿连同反应液放入 25°C 水浴锅中水浴 3min, 然后迅速拿出擦干测定 3min 的吸光度 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

三、糜蛋白酶活性计算公式:

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义: 25°C 每毫克蛋白每分钟水解 1 μmol BTEE 为一个酶活单位。

$$\text{糜蛋白酶活 (U/mg prot)} = (\Delta A \times V_{\text{反总}} \div \epsilon \div d) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 3.8 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义: 25 度每克样品每分钟水解 1 μmol BTEE 为一个酶活单位。

$$\text{糜蛋白酶活 (U/g 鲜重)} = (\Delta A \times V_{\text{反总}} \div \epsilon \div d) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 3.8 \times \Delta A \div W$$

(3) 按血清 (浆) 体积计算

活性单位定义: 25°C 每毫升血清 (浆) 每分钟水解 1 μmol BTEE 为一个酶活单位。

$$\text{糜蛋白酶活 (U/mL)} = (\Delta A \times V_{\text{反总}} \div \epsilon \div d) \div V_{\text{样}} \div T = 3.8 \times \Delta A$$

V 样: 加入反应体系中粗酶液体积, 0.02mL; Cpr: 粗酶液蛋白浓度, mg/mL, 需要另外测定;
W: 样本鲜重, g; V 反总: 反应总体积, 0.22 mL; V 提取: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 3 min; ε: BTEE 消光系数: 0.964 mL/μmol/cm; d: 比色皿光径, 1cm。

注意事项:

- 1 当 ΔA 大于 0.2 或者吸光值大于 1 时, 建议将样品稀释后测定。
- 2 当 ΔA 小于 0.03 时, 建议将样品浓缩或者增加样品体积进行测定, 注意计算公式除以浓缩倍数或者改变体积。