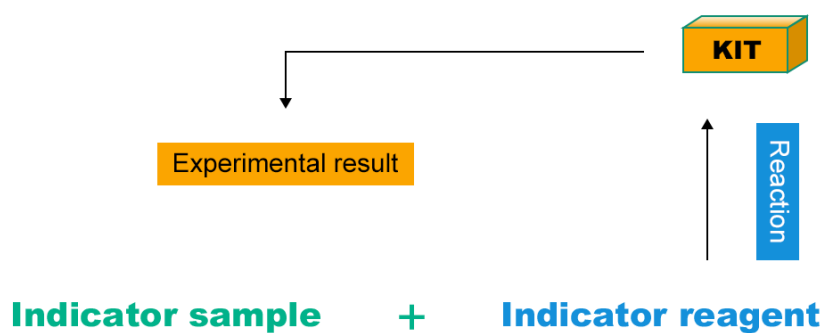


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0405

Size: 100T/96S

糜蛋白酶 (Chymotrypsin) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义：

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。

二、测定原理：

糜蛋白酶催化ATEE水解, 产物在237nm有特征光吸收; 通过测定237nm光吸收增加速率, 来计算糜蛋白酶活性。

三、需自备的仪器和用品：

台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (ZC-1036: UV板)、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃避光保存	临用前加入 20mL 蒸馏水充分溶解

五、粗酶液提取：

组织样品：按照组织质量 (g) : 试剂一体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 冰浴匀浆, 8000g, 4℃离心 10min, 取上清, 即粗酶液。

六、测定步骤：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到237nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二置于37℃水浴中保温30min。
3. 空白管：取微量石英比色皿/96孔板，加入20 μL试剂一，200 μL试剂二，混匀于237nm测定4min内吸光值变化，记为 ΔA 空白管。（从吸光值稳定增加开始计时）
4. 测定管：取微量石英比色皿/96孔板，加入20 μL 粗酶液，200 μL试剂二，混匀于237nm测定4min内吸光值变化，记为 ΔA 测定管。（从吸光值稳定增加开始计时）

注意：空白管只需要测定一次。

七、糜蛋白酶活性计算公式：

- 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

（1）按蛋白浓度计算

活性单位定义：25℃每毫克蛋白每分钟催化吸光值增加1为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{糜蛋白酶 (U/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 2.75 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

（2）按样本质量计算

活性单位定义：25℃每克样品每分钟催化吸光值增加1为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{糜蛋白酶 (U/g)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 2.75 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W\end{aligned}$$

W：样品质量（g）；Cpr：粗酶液蛋白质浓度（mg/mL），需要另外测定；V1：加入反应体系中粗酶液体积（mL），20 μL=2×10⁻² mL；V2：粗酶液总体积（mL），1 mL；V 反总：反应总体积，220 μL=0.22mL；T：反应时间（min），4min。

● 使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：25℃每毫克蛋白每分钟催化吸光值增加1为一个酶活单位。

$$\text{糜蛋白酶 (U/mg prot)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V1) \div T$$

$$= 2.75 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：25℃每克样品每分钟催化吸光值增加1为一个酶活单位。

$$\text{糜蛋白酶 (U/g)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div (W \times V1 \div V2) \div T$$

$$= 2.75 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

W: 样品质量 (g); Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; V1: 加入反应体系中粗酶液体积 (mL), $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{ mL}$; V2: 粗酶液总体积 (mL), 1 mL; V 反总: 反应总体积, $220 \mu\text{L} = 0.22 \text{ mL}$; T: 反应时间 (min), 4min。

八、注意事项:

临用前配制的试剂配置好后 3 天内使用完毕