

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-S0681

Size: 50T/48S

糜蛋白酶检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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 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。

三、需自备的仪器和用品:

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。

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
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	

五、操作步骤：

● 粗酶液提取

1. 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。

2. 血清（浆）直接检测

● 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℃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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

六、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℃每毫克蛋白每分钟水解 1 μmol BTEE 为一个酶活单位。

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

(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 $1\ \mu\text{mol}$ BTEE 为一个酶活单位。

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℃每毫升血清（浆）每分钟水解 $1\ \mu\text{mol}$ BTEE 为一个酶活单位。

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/ $\mu\text{mol}/\text{cm}$ ；d：比色皿光径，1cm。

七、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。