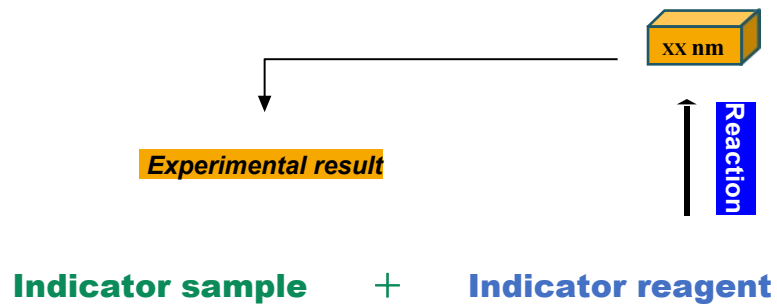


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 糜蛋白酶 (Chymotrypsin) 试剂盒说明书

### 微量法

**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。

**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。

**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。

**自备仪器和用品：**

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(UV板)、冰和蒸馏水。

**试剂组成和配制：**

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

**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。

**测定步骤：**

- 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到237nm，蒸馏水调零。
- 试剂二置于37℃水浴中保温30min。
- 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）
- 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。

**糜蛋白酶活性计算公式：**

**a. 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。

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

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：25°C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),  $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{ mL}$ ; 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。

b. 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°C每毫克蛋白每分钟催化吸光值增加1为一个酶活单位。

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

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：25°C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),  $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{ mL}$ ; 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。

注意事项:

临用前配制的试剂配置好后3天内使用完毕