

糜蛋白酶活性检测试剂盒说明书

Chymotrypsin Assay Kit

微量法

货号：AK132

规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK132-A	50ml×1 瓶	4℃保存；
AK132-B	粉剂×1 瓶	4℃避光保存；临用前加入 20 mL 蒸馏水充分溶解。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：糜蛋白酶 (Chymotrypsin) 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。临幊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。

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

自备用品：

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

粗酶液提取：

组织样品：按照组织质量 (g): AK132-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL AK132-A) 冰浴匀浆，8000g, 4℃离心 10min, 取上清，即粗酶液。

测定步骤：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到237 nm，蒸馏水调零。
2. AK132-B 置于37℃水浴中保温30min。
3. 取微量玻璃比色皿或 96 孔板加入下列试剂：

试剂名称	空白管 (ul)	测定管 (ul)
AK132-A	20	
AK132-B	200	
混匀于237nm 测定4min 内吸光值变化，记为△A 空白管。(从吸光值稳定增加开始计时)		
粗酶液		20
AK132-B		200
混匀于237nm 测定4min 内吸光值变化，记为△A 测定管。(从吸光值稳定增加开始计时)		

注意：空白管只需测定一次。

糜蛋白酶活性计算公式：

- a. 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℃每克样品每分钟催化吸光值增加 1 为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{糜蛋白酶 (U/g)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_1 \div V_2) \div T \\ &= 2.75 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W\end{aligned}$$

注：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℃每毫克蛋白每分钟催化吸光值增加 1 为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{糜蛋白酶 (U/mg prot)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_1) \div T \\ &= 2.75 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div Cpr\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：25℃每克样品每分钟催化吸光值增加 1 为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{糜蛋白酶 (U/g)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_1 \div V_2) \div T \\ &= 2.75 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W\end{aligned}$$

注：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：

1. 测定前须先取 1~2 个样做预实验，使得吸光值在 5min 内呈线性变化。测定过程操作须迅速。
2. AK132-B 试剂配制好后 3 天内使用完。