

## 菠萝蛋白酶检测试剂盒(福林微板法)

### 产品简介

菠萝蛋白酶(Bromelain)简称菠萝酶,亦称凤梨酶、凤梨酵素等,是存在于菠萝植株中的蛋白水解酶,可从菠萝果茎、叶、皮提取出来,经精制、提纯、浓缩、酶固定化、冷冻干燥而得到,菠萝蛋白酶已被广泛应用于食品、医药等行业,利用吸附力、离子键、共价键等不同的联结方式,将酶与不溶性载体联结制成固定化酶,可以很好的避免酶的失活,易于储存运输。

菠萝蛋白酶检测试剂盒(福林微版)检测原理是通过菠萝蛋白酶催化底物酪蛋白水解生成酪氨酸,酪氨酸含有酚羟基,可与福林试剂发生福林反应,即福林试剂在碱性条件下容易定量的被酚类化合物还原,生成钨蓝和钼蓝的混合物呈现不同深浅的蓝色,于酶标仪680nm处检测吸光度,吸光度的大小与酪氨酸含量的多少有关,吸光度大说明酪氨酸含量高,也就是说菠萝蛋白酶分解的酪蛋白多,酶活性高,主要用于检测植物组织尤其是菠萝匀浆液中菠萝蛋白酶的活性。该试剂盒仅用于科研领域,不适用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成

| 名称 \ 编号                       | ADS053TE0<br>100T | Storage |
|-------------------------------|-------------------|---------|
| 试剂(A): 组织匀浆液                  | 500ml             | RT      |
| 试剂(B): Bromelain Lysis Buffer | 500ml             | RT      |
| 试剂(C): Bromelain 洗脱液          | 100ml             | 4°C     |
| 试剂(D): 酪蛋白溶液                  | 10ml              | 4°C     |
| 试剂(E): 酪蛋白终止液                 | 30ml              | RT 避光   |
| 试剂(F): 酪氨酸标准(0.1mg/ml)        | 1ml               | 4°C 避光  |
| 试剂(G): Bromelain Assay Buffer | 20ml              | RT      |
| 试剂(H): 福林试剂                   | 4ml               | 4°C 避光  |
| 使用说明书                         | 1份                |         |

### 自备材料

- 1、蒸馏水
- 2、研钵或匀浆器、离心管、试管、低温离心机
- 3、水浴锅或恒温箱、酶标板、酶标仪

## 操作步骤(仅供参考)

### 1、准备样品:

①植物样品: 取10g菠萝肉或植物组织, 切碎后在研钵或匀浆器中加入等体积组织匀浆液进行研磨或匀浆, 4°C静置30min, 滤纸或4~6层纱布过滤, 留取滤液, 边搅拌边加入10ml Bromelain Lysis Buffer, 搅拌约10min, 4°C静置1h, 4°C 4000r/min 离心7~10min, 弃上清液, 收集沉淀, 加入2~3倍体积的Bromelain洗脱液, 搅拌洗脱20min;再次4°C 4000r/min离心7~10min, 取上清液, -20°C冻存, 用于菠萝蛋白酶的检测。

②固定化酶: 称取适量的固定化酶, 溶解于0.5ml组织匀浆液, 混匀, -20°C冻存待用。

③高活性样品: 如果样品中含有较高活性的菠萝蛋白酶, 可以使用蒸馏水或组织匀浆液进行恰当的稀释。

2、处理待测样品: 取两支离心管, 按下表顺序依次操作。含有测定液和对照液的离心管室温放置15min, 3000r/min离心7~10min, 分别取上清液待用。

| 单位: ml              | 样品对照孔 |
|---------------------|-------|
| 待测样品(提前 40°C孵育)     | 0.1   |
| 酪蛋白终止液(提前 40°C孵育)   | 0.3   |
| 摇匀灭活。               |       |
| 酪蛋白溶液(提前 40°C孵育)    | 0.1   |
| 混匀后 40°C准确孵育 10min。 |       |

| 单位: ml              | 样品测定孔 |
|---------------------|-------|
| 待测样品(提前 40°C孵育)     | 0.1   |
| 酪蛋白溶液(提前 40°C孵育)    | 0.1   |
| 混匀后 40°C准确孵育 10min。 |       |
| 酪蛋白终止液(提前 40°C孵育)   | 0.3   |
| 摇匀灭活。               |       |

3、稀释系列酪氨酸标准: 取适量的酪氨酸标准(0.1mg/ml), 按下表配制不同浓度的酪氨酸标准备用。

| 加入物质(μl)        | 1    | 2    | 3    | 4    | 5   |
|-----------------|------|------|------|------|-----|
| 酪氨酸标准(0.1mg/ml) | 10   | 20   | 30   | 40   | 50  |
| 蒸馏水             | 40   | 30   | 20   | 10   | 0   |
| 酪氨酸浓度(mg/ml)    | 0.02 | 0.04 | 0.06 | 0.08 | 0.1 |

- 4、Bromelain加样：取96孔板，按照下表设置空白孔、标准孔、样品对照孔、样品测定孔，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡；如果样品中的菠萝蛋白酶活性过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置2平行管，求平均值。

| 加入物质(μl)               | 空白孔 | 标准孔 | 样品对照孔 | 样品测定孔 |
|------------------------|-----|-----|-------|-------|
| 蒸馏水                    | 35  | —   | —     | —     |
| 系列酪氨酸标准(1~5号)          | —   | 35  | —     | —     |
| 对照液                    | —   | —   | 35    | —     |
| 测定液                    | —   | —   | —     | 35    |
| Bromelain Assay Buffer | 175 | 175 | 175   | 175   |
| 福林试剂                   | 35  | 35  | 35    | 35    |

- 5、Bromelain测定：充分混匀，40℃孵育显色15min，以对照孔调零，酶标仪测定680nm处测定孔的吸光度；同时以空白孔调零，酶标仪测定680nm处系列酪氨酸标准(1~5号)孔的吸光度。

**计算：**以系列酪氨酸标准(1~5号)浓度(mg/ml)为横坐标，对应的吸光度值为纵坐标，绘制酪氨酸标准曲线，通过样品测定管的吸光度，在标准曲线上查得各测定孔中酪氨酸浓度。菠萝蛋白酶活性单位的定义：在40℃pH7.0时，每分钟水解酪蛋白产生1μg酪氨酸所需的酶量为一个活性单位；其比活力定义：每毫克蛋白所含蛋白酶活力单位的数量。

$$\text{菠萝蛋白酶(U)} = (\text{测定液的酪氨酸浓度} \times 1000) / 15$$

式中：测定管的酪氨酸浓度单位为mg/ml

1000=μg与mg的单位换算

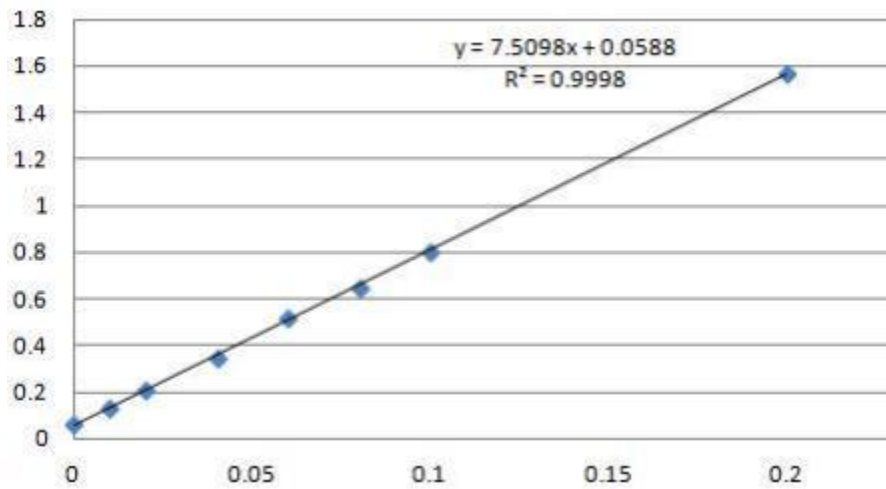
15=孵育时间15min

### 注意事项

- 1、待测样品中不能含有酶抑制剂，同时需避免反复冻融。
- 2、菠萝蛋白酶提取时，注意低温操作，防止酶活性，亦可-20℃保存。
- 3、如果没有酶标仪，也可以使用分光光度计测定，每次检测指标不宜过多，否则操作时间不一，有可能导致样本间的差异。
- 4、离心时最好采用低温离心机，常温离心机也可。
- 5、酪蛋白终止液有一定腐蚀性，请小心操作。
- 6、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**有效期：**6个月。低温运输，按要求保存。

**附录：**标准曲线制作：参考说明书操作，用酶标仪630nm对系列酪氨酸标准(0、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.20mg/ml)进行吸光度的测定，其标准曲线如下(仅供参考)：



注意：由于检测仪器和操作手法等条件的不同，标准曲线会有差异，该值仅供参考，根据测定经验显示酪氨酸标准浓度在0.002mg/ml以下，0.30mg/ml以上，标准曲线会有偏差。