

## 糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶 (Chymotrypsin) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-D006 微板法 96 样)

### 一、产品简介:

糜蛋白酶 (EC 3.4.21.1) 又称胰凝乳蛋白酶, 是胰腺分泌的一种蛋白水解酶, 具有肽链内切酶的作用, 通过切断蛋白质肽链中酪氨酸、苯丙氨酸的羧端肽链作用, 专一水解羧端芳香族氨基酸。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。

本试剂盒采用糜蛋白酶催化水解 N-琥珀酰-丙酰氨-丙酰氨-脯酰氨-苯丙氨酸对硝基酰苯胺 (SAAPFpNA) 生成对硝基苯胺, 后者在 405nm 有最大吸收峰, 通过测定吸光值升高速率即可得出糜蛋白酶的活性大小。

### 二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 0.6mL×1 支	-20°C保存	若凝固则可于 37°C水浴至融化, 再加 3.8mL 蒸馏水混匀备用。
标准品	粉体 1 支	4°C保存	若重做标曲, 则用到该试剂。

### 三、所需的主要仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、天平、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备:

##### ① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×4000rpm 离心 5min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取

② 液体样本: 若是澄清液体, 直接检测, 若液体样本浑浊, 需 4°C×12000rpm, 离心 10min, 取上清液检测。

#### 2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。

② 所有试剂解冻至室温。在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	30
试剂一	130
试剂二	40
混匀, 立即于 405nm 处测定吸光值 A1, 37°C 条件下反应 5min 后读取 A2, $\Delta A=A2-A1$ 。	

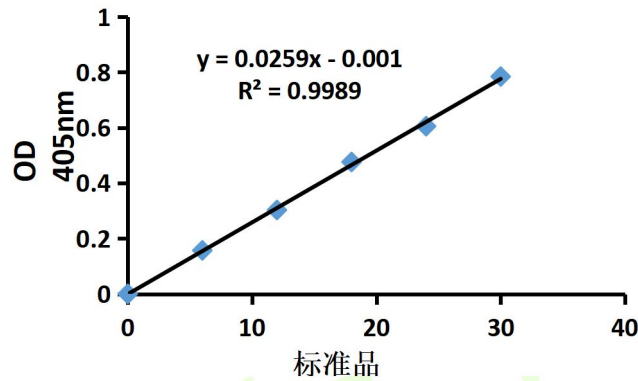
【注】1. 若  $\Delta A$  在零附近徘徊, 可以延长反应时间 T (如延长至 10min 后读取 A2) 或增加样本量 V1 (如增至 60μL, 则试

剂一相应减少)，则改变后的反应时间 T 和样本量 V1 需代入计算公式重新计算。

2. 若  $\Delta A$  大于 0.5，可缩短反应时间 T（如缩至 2min 后读取 A2）或减少样本量 V1（如减至 10 $\mu$ L，则试剂一相应增加），则改变后的反应时间 T 和样本量 V1 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

- 1、标准曲线：  $y = 0.0259x - 0.001$ ： x 为标准品(nmoL)， y 为  $\Delta A$ 。



- 2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶(nmol/min/g 鲜重)=[ $(\Delta A + 0.001) \div 0.0259$ ]  $\div$  (W $\times$ V1 $\div$ V)  $\div$  T = 257.4 $\times$ ( $\Delta A + 0.001$ )  $\div$  W

- 3、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶(nmol/min/mg prot)=[ $(\Delta A + 0.001) \div 0.0259$ ]  $\div$  (V1 $\times$ Cpr)  $\div$  T  
= 257.4 $\times$ ( $\Delta A + 0.001$ )  $\div$  Cpr

- 4、按照液体体积计算：

单位定义：每毫升液体每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活单位 (U)。

糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶(nmol/min/mL)=[ $(\Delta A + 0.001) \div 0.0259$ ]  $\div$  V1  $\div$  T = 257.4 $\times$ ( $\Delta A + 0.001$ )

V---加入提取液体积， 1 mL；

V1---加入样本体积， 0.03 mL；

W---样本质量， g；

T---反应时间， 5min；

Cpr---样本蛋白质浓度， mg/mL； 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (50 $\mu$ mol/mL)：临用前甩几下或离心，使粉体落入底部，加入 0.5mL 乙醇，涡旋震荡溶解后再加入 0.5mL 的蒸馏水混匀，得到 50 $\mu$ mol/mL 备用。
- 2 用蒸馏水把母液稀释成以下浓度：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 $\mu$ mol/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 3 30 $\mu$ L 标准品+170 $\mu$ L 试剂一，混匀后于 405nm 处读取 A 值，依据结果即可制作标准曲线。