

## 糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶 (Chymotrypsin) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-D006-48 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

### 一、指标介绍:

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:

| 试剂组分 | 试剂规格         | 存放温度   | 注意事项                                                       |
|------|--------------|--------|------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶  | 4℃保存   |                                                            |
| 试剂一  | 液体 7mL×1 瓶   | 4℃保存   |                                                            |
| 试剂二  | 液体 0.3mL×1 瓶 | -20℃保存 | 1. 若凝固则可于 37℃水浴至融化;<br>2. 加 1.9mL 蒸馏水混匀备用 (保存周期与试剂盒有效期相同)。 |
| 标准品  | 粉体 1 支       | 4℃避光保存 | 若重做标曲, 则用到该试剂。                                             |

### 三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 1、样本提取:

##### ① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4℃×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℃×12000rpm, 离心 10min, 取上清液检测。

##### ③ 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 4℃×4000rpm 离心 5min, 取上清, 置冰上待测。

#### 2、检测步骤:

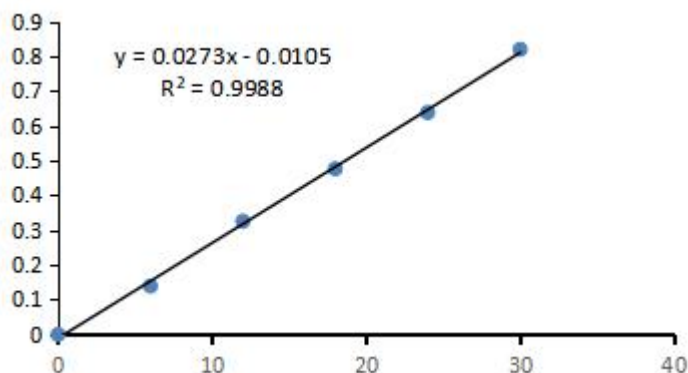
- ① 酶标仪预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），设定波长到 405nm；
- ② 所有试剂解冻至室温。在 EP 管中依次加入：

| 试剂组分（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℃ 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 10μL，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： $y = 0.0273x - 0.0105$ ；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）。

$$\text{糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶(nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0105) \div 0.0273] \div (W \times V1 \div V) \div T = 122.1 \times (\Delta A + 0.0105) \div W$$

- 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）。

$$\text{糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶(nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0105) \div 0.0273] \div (V1 \times Cpr) \div T = 122.1 \times (\Delta A + 0.0105) \div Cpr$$

- 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）。

$$\text{糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶(nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0105) \div 0.0273] \div V1 \div T = 122.1 \times (\Delta A + 0.0105)$$

- 5、按细胞数量计算：

单位定义：每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位（U）。

$$\text{糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0105) \div 0.0273] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.244 \times (\Delta A + 0.0105)$$

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；

500---细胞数量，万；

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 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液（50 $\mu$ mol/mL）：临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底，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
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 $\mu$ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

|                                                                |     |     |     |     |     |     |
|----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 吸取标准品母液 100 $\mu$ L，加入 4.9mL 蒸馏水，混匀得到 1 $\mu$ mol/mL 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
| 标品浓度<br>$\mu$ mol/mL                                           | 0   | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 |
| 标品稀释液<br>uL                                                    | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL                                                           | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |
| 各标准管混匀待用。                                                      |     |     |     |     |     |     |

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

| 试剂组分（ $\mu$ L）                                                     | 标准管 | 0 浓度管（仅做一次） |
|--------------------------------------------------------------------|-----|-------------|
| 标品                                                                 | 30  |             |
| 蒸馏水                                                                |     | 30          |
| 试剂一                                                                | 170 | 170         |
| 混匀，于 405nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{0 \text{ 浓度}}$ |     |             |