

糜蛋白酶（Chymotrypsin）试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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 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：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加入 20 mL 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：

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. 试剂二置于 37℃ 水浴中保温 30min。
3. **空白管：**取微量石英比色皿/96 孔板，加入 20μL 试剂一，200μL 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）
4. **测定管：**取微量石英比色皿/96 孔板，加入 20μL 粗酶液，200μL 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。

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

(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。

$$\begin{aligned} \text{糜蛋白酶 (U/g 鲜重)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 2.75 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

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 μ L=2 $\times 10^{-2}$ mL; V2: 粗酶液总体积 (mL), 1 mL; V 反总: 反应总体积, 220 μ L=0.22mL; 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。

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

(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。

$$\begin{aligned} \text{糜蛋白酶 (U/g 鲜重)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 2.75 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

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 μ L=2 $\times 10^{-2}$ mL; V2: 粗酶液总体积 (mL), 1 mL; V 反总: 反应总体积, 220 μ L=0.22mL; 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。