

## 糜蛋白酶 (Chymotrypsin) 试剂盒说明书

### 微量法 100T/96S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 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。

#### 组成：

产品名称	PI012-100T/96S	Storage
试剂一：液体	100ml	4°C
试剂二：粉剂	1 瓶	4°C避光
说明书	一份	

试剂二：粉剂×1 瓶，4°C避光保存。临用前加入 20 ml 蒸馏水充分溶解。

#### 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。

#### 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°C 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°C 水浴中保温 30min。
3. 空白管：取微量石英比色皿/96 孔板，加入 20 $\mu$ l 试剂一，200 $\mu$ l 试剂二，混匀于 237nm 测定 4min 内吸光值变化，记为  $\Delta A$  空白管。（从吸光值稳定增加开始计时）

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



4. **测定管**：取微量石英比色皿/96孔板，加入20 $\mu$ l粗酶液，200 $\mu$ l试剂二，混匀于237nm测定4min内吸光值变化，记为 $\Delta A$ 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 $^{\circ}$ C每毫克蛋白每分钟催化吸光值增加1为一个酶活单位。

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

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：25 $^{\circ}$ C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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $^{\circ}$ C每毫克蛋白每分钟催化吸光值增加1为一个酶活单位。

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

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：25 $^{\circ}$ C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 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

