

糜蛋白酶活性检测试剂盒说明书

Chymotrypsin Assay Kit

分光光度法

货号: AK131

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK131-A	50ml×1 瓶	4℃保存;
AK131-B	粉剂×1 瓶	4℃避光保存。临用前加入 50 mL 蒸馏水充分溶解。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 糜蛋白酶 (Chymotrypsin) 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。

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。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、水浴锅、天平、烘箱、玻璃管、离心机、可调式移液枪、蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 组织样品: 按照组织质量 (g): AK131-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK131-A) 冰浴匀浆, 8000g, 4℃离心 10min, 取上清, 即粗酶液。
2. 血清等液体: 直接测定。

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. AK131-B 置于37℃水浴中保温30min。
3. 取取1mL 石英比色皿加入下列试剂:

试剂名称	空白管 (ul)	测定管 (ul)
AK131-A	100	
AK131-B	1000	
混匀于237nm 测定4min 内吸光值变化, 记为△A 空白管。(从吸光值稳定增加开始计时)		
粗酶液		100
AK131-B		1000
混匀于237nm 测定4min 内吸光值变化, 记为△A 测定管。(从吸光值稳定增加开始计时)		

注意: 空白管只需测定一次。

糜蛋白酶活性计算公式:

(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。

糜蛋白酶 (U/mg prot) = $(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反应}} \div (C_{\text{pr}} \times V_1) \div T = 2.75 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}$

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), 100μL=0.1

mL; V 反总: 反应总体积, 1100 μ L=1.1mL; T: 反应时间 (min), 4min。

(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。

糜蛋白酶 (U/g) = $(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V1 \div V2) \div T = 2.75 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$

注: W: 样品质量 (g); V1: 加入反应体系中粗酶液体积 (mL), 100 μ L=0.1 mL; V2: 粗酶液总体积 (mL), 1 mL; V 反总: 反应总体积, 1100 μ L=1.1mL; T: 反应时间 (min), 4min。

注意事项:

1. 测定前须先取 1~2 个样做预实验, 使得吸光值在 5min 内程线性变化。测定过程操作须迅速。
2. AK131-B 试剂配制好后 3 天内使用完。