

糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶（Chymotrypsin）试剂盒说明书

(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℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 0.6mL×1 支	-20℃保存	若凝固则可于 37℃水浴至融化，再加 3.8mL 蒸馏水混匀备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃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℃×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。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm。

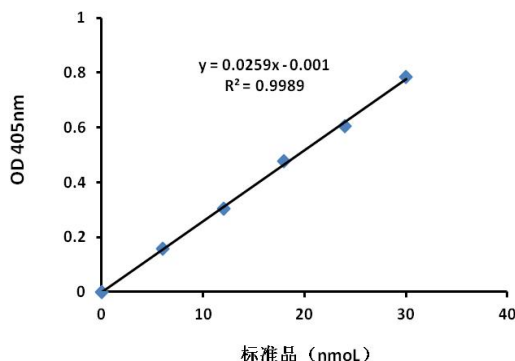
② 所有试剂解冻至室温。在 EP 管中依次加入：

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℃条件下反应 5min 后读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

- 【注】** 1. 若 ΔA 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 60 μ L, 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 ΔA 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 μ 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(nmolL), y 为 ΔA 。



- 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 μ 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 μ 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 μ mol/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 3 30 μ L 标准品+170 μ 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。