

糜蛋白酶测试盒说明书

(货号: A080-3-1 比色法 50管/24样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

以酪蛋白为底物,糜蛋白酶可水解蛋白产生含酚的氨基酸,而酚试剂可被含酚的氨基酸还原成蓝色物质,通过比色可测定糜蛋白酶活力。

二、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿(或酶标仪(660nm)及 96 孔板),涡旋混匀器,37℃水浴锅,离心机,蒸馏水,蛋白测定试剂(本公司有售)。

三、试剂盒组成与配制:(试剂盒有效期 3 个月)

试剂一: 液体 24mL×1 瓶,4℃保存。

试剂二: 液体 6mL×2 瓶,4℃保存。

试剂三: 液体 100mL×1 瓶,4℃保存。

试剂四: 液体 9mL×2 瓶,4℃避光保存。

试剂五: 1mg/mL 酪氨酸标准品贮备液 1mL×1 瓶,标准品稀释液 20mL×1 瓶,4℃保存。**50μg/mL 标准应用液的配制:** 取 1mg/mL 标准品贮备液 50μL 用标准品稀释液稀释至 1mL,或按 1:19(体积比)稀释,充分混匀后,4℃可保存。

试剂六: 匀浆介质 60mL×2 瓶,4℃保存。

四、操作步骤:

1、样本前处理:

组织样本: 准确称取组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的匀浆介质(试剂六),低温(0-4℃)条件下匀浆,制成 10%的组织匀浆,4000 转/分,离心 10 分钟,取上清液置冰上待测(当天内有效)。取 1-2 例进行预试后(预试结果以测定 OD - 对照 OD 值差值在 0.2-0.3 为宜,若是差值较小可直接选用原液测定,或可再延长酶促反应 37℃准确反应时间)选择适宜的样本匀浆浓度再批量测定。

液体样本: 直接检测。

2、操作表:

第①步 酶促反应:

	测定管	对照管
样本 (mL)	0.04	0.04
37℃水浴预温 2 分钟		
试剂二 (mL)	0.20	0.20
	混匀,37℃准确反应 10 分钟后加试剂一	混匀后立即加试剂一
试剂一 (mL)	0.4	0.4
充分混匀,4000 转/分离心 10 分钟,取上清作显色反应		

第②步 显色反应:

	空白管	标准管	测定管	对照管
标准品稀释液 (mL)	0.3			
50μg/mL 标准应用液 (mL)		0.3		
酶促反应的上清 (mL)			0.3	0.3
试剂三 (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5
试剂四 (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3
充分混匀,37℃水浴 20 分钟后取出冷却至室温,波长 660nm,1cm 光径,蒸馏水调零,分光光度计测各管 OD 值(A)(或是每管吸取 200μL 反应液到 96 孔板中,酶标仪 660nm 处读数)。				

注: 因不同的样本之间有差异,所以要求每个样本都做对照管;而标准管及空白管只需各做 1~2 只;若测定-对照 OD 值差值较小,可延长测定管酶促反应第一个 37℃反应时间(如 20 或 30 分钟等),将差值尽量控制在 0.01 以上。

五、计算公式:

1、组织样本按蛋白浓度计算:

① 定义:每毫克组织蛋白 37℃每分钟分解蛋白生成 1μg

氨基酸相当于 1 个酶活力单位 U(1μg 酪氨酸/分钟/mg 蛋白)。

② 计算公式:

$$\text{糜蛋白酶活力 (U/mg 蛋白)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div T \times N \div C_{\text{pr}}$$

2、组织样本按样本质量计算:(一般不推荐此法)

① 定义:每克组织在 37℃每分钟分解蛋白生成 1μg 氨基酸相当于 1 个酶活力单位 U(1μg 酪氨酸/分钟/g 组织)。

② 计算公式:

$$\text{糜蛋白酶活力 (U/g 组织)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div T \times N \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

3、液体样本计算:

① 定义:每毫升样本在 37℃每分钟分解蛋白生成 1μg 氨基酸相当于 1 个酶活力单位 U(1μg 酪氨酸/分钟/毫升)。

② 计算公式:

$$\text{糜蛋白酶活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div T \times N$$

以上公式中:

C_{标准}: 标准品浓度, 50μg/mL;

V_{反应}: 酶促反应体系总体积, 0.64mL;

V_样: 酶促反应样本加入量, 0.04mL;

T: 反应时间, 10min;

N: 样本测试前的稀释倍数;

C_{pr}: 组织匀浆蛋白浓度, mg/mL;

W: 组织样本重量, g;

V_{样总}: 样本匀浆时的总体积, mL。

六、计算举例:

取鱼肠道 10%组织匀浆原液按操作表操作,得空白管 OD 值为 0.017,标准管 OD 值为 0.509,测定管 OD 值为 0.337,对照管 OD 值为 0.306,10%匀浆蛋白浓度为 4.557 mgprot/mL 则计算为:

$$\begin{aligned} \text{糜蛋白酶活力 (U/mgprot)} &= \frac{0.337 - 0.306}{0.509 - 0.017} \times 50 \times 16 \div 10 \div 4.557 \\ &= 1.106 \text{ U/mgprot} \end{aligned}$$

七、测定意义:

糜蛋白酶又称胰凝乳蛋白酶(Chymotrypsin),系从牛或猪胰中提取的一种蛋白水解酶,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(酪氨酸、色氨酸、亮氨酸)或侧链大体积疏水性残基甲硫氨酸等。可以分解炎症部位纤维蛋白的凝块,促进血凝块、脓性分泌物及坏死组织的溶化分解,从而净化创面,使肉芽组织新生,促进伤口愈合。其在眼科、皮肤科做临床局部应用已被肯定,也可用于创口或局部炎症,以减少局部分泌和水肿。近年来随着临床药理学研究的不断发展,其临床应用范围也日渐广泛。

八、注意事项:

- 1、食糜样本因水分差异较大而使得样本匀浆后溶液浓度差异大,故测试时应多注意样本浓度差异;
- 2、组织样本匀浆后需尽快检测,匀浆液不可冷冻;
- 3、组织匀浆液测蛋白浓度时可选用本公司 A045-2(考马斯亮蓝法)蛋白定量试剂盒或者 A045-3/-4 (BCA 法)蛋白定量试剂盒。

附录：酪氨酸标准曲线制作（可不做）

1、操作表：

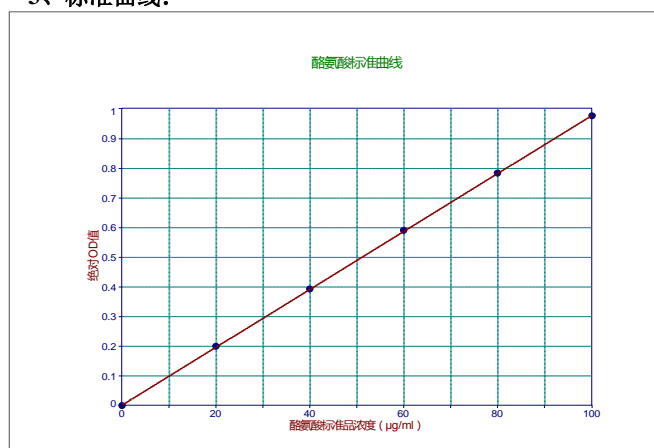
管号	0	1	2	3	4	5
标准品稀释液（mL）	0.3	0.24	0.18	0.12	0.06	
100 μ g/mL 酪氨酸标准（mL）		0.06	0.12	0.18	0.24	0.3
试剂三（mL）	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
试剂四（mL）	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

混匀，37 $^{\circ}$ C水浴 20 分钟，取出冷却，于 660nm，1cm 光径，蒸馏水调零，分光光度计比色。

2、检测结果：

管号	0	1	2	3	4	5
酪氨酸标准浓度（ μ g/mL）	0	20	40	60	80	100
测定 OD 值	0.016	0.217	0.410	0.607	0.800	0.993
绝对 OD 值	0.000	0.201	0.394	0.591	0.784	0.977

3、标准曲线：



（标准曲线用户可以不做，用前面列出的计算公式计算即可；若是制作了标准曲线，则可将样本测定管减去对照管的差值代入标准曲线计算，所得结果代替计算公式中的

$$\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$$

项，继续按各自样本计算公式运算，即可

得最终结果)