

糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶（Chymotrypsin）试剂盒说明书

（货号：BP10013W 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 瓶	-20℃保存	1. 若凝固则可于 37℃水浴至融化； 2. 加 3.8mL 蒸馏水混匀备用（保存周期与试剂盒有效期相同）。
标准品	粉体 1 支	4℃避光保存	若重做标曲，则用到该试剂。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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。

③ 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；4℃×4000rpm 离心 5min，取上清，置冰上待测。

2、检测步骤：

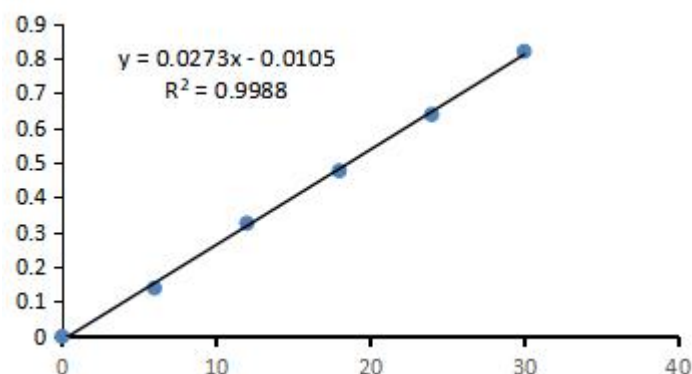
- ① 酶标仪预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），设定波长到 405nm；
- ② 所有试剂解冻至室温。在 EP 管中依次加入：

试剂组分（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 60μL，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 10μL，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： $y = 0.0273x - 0.0105$ ：x 为标准品(nmoL)，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）。

$$\text{糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶(nmoL/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0105) \div 0.0273] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 244.2 \times (\Delta A + 0.0105) \div W$$

- 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）。

$$\text{糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶(nmoL/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0105) \div 0.0273] \div (V1 \times Cpr) \div T$$

$$= 244.2 \times (\Delta A + 0.0105) \div Cpr$$

- 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）。

$$\text{糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶(nmoL/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0105) \div 0.0273] \div V1 \div T$$

$$= 244.2 \times (\Delta A + 0.0105)$$

- 5、按细胞数量计算：

单位定义：每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1nmoL 对硝基苯胺为一个酶活单位（U）。

$$\text{糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶(nmoL/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0105) \div 0.0273] \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$= 0.488 \times (\Delta A + 0.0105)$$

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；

500---细胞数量，万；

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 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液（50 μ mol/mL）：临用前 8000g 4 $^{\circ}$ C离心 2min 使试剂落入管底，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
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 100 μ L，加入 4.9mL 蒸馏水，混匀得到 1 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

在 EP 管中依次加入：

试剂组分（ μ L）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	30	
蒸馏水		30
试剂一	170	170
混匀，于 405nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{0 浓度}}$		