

## 糜蛋白酶（Chymotrypsin）试剂盒说明书

微量法100T/96S

**注意：**正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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。

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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体100mL×1瓶，4°C保存。

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。

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20μL试剂一，200μL试剂二，混匀于237nm测定4min内吸光值变化，记为ΔA空白管。（从吸光值稳定增加开始计时）
4. **测定管：**取微量石英比色皿/96孔板，加入20μL粗酶液，200μL试剂二，混匀于237nm测定4min内吸光值变化，记为ΔA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°C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）=（ΔA测定管－ΔA空白管）×V反总÷（Cpr×V1）÷T

=2.75×（ΔA测定管－ΔA空白管）÷Cpr

（2）按样本质量计算

活性单位定义：25°C每克样品每分钟催化吸光值增加1为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{糜蛋白酶 (U/g 鲜重)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_1 \div V_2) \div T \\ &= 2.75 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W\end{aligned}$$

W: 样品质量 (g); Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; V<sub>1</sub>: 加入反应体系中粗酶液体积 (mL), 20 $\mu$ L=2 $\times$ 10<sup>-2</sup> mL;  
V<sub>2</sub>: 粗酶液总体积 (mL), 1 mL; V<sub>反总</sub>: 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°C每毫克蛋白每分钟催化吸光值增加1为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{糜蛋白酶 (U/mg prot)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_1) \div T \\ &= 2.75 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div Cpr\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：25°C每克样品每分钟催化吸光值增加1为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{糜蛋白酶 (U/g 鲜重)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_1 \div V_2) \div T \\ &= 2.75 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W\end{aligned}$$

W: 样品质量 (g); Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; V<sub>1</sub>: 加入反应体系中粗酶液体积 (mL), 20 $\mu$ L=2 $\times$ 10<sup>-2</sup> mL;  
V<sub>2</sub>: 粗酶液总体积 (mL), 1 mL; V<sub>反总</sub>: 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。