

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 N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 水解，产物在 410nm 有特征光吸收；通过测定 410 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、酶标仪、96 孔板、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 避光保存。

粗酶液提取：

组织样品：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）冰浴匀浆，8000g，4℃ 离心 10min，取上清，即粗酶液。

测定步骤：

1. 酶标仪预热 30min，调节波长到 410 nm。
2. 试剂二的配制：临用前加入 20 mL 试剂一充分溶解，置于 37℃ 水浴中预热 5min，用不完的试剂 4℃ 保存一周。
3. 96 孔板中加入 20μL 粗酶液，180μL 试剂二，立即混匀并在 37℃ 下测定 410nm 处 3min 时吸光值 A1 与 8min 时吸光值 A2，记录 $\Delta A = A2 - A1$ 。

糜蛋白酶活性计算公式：

（1）按蛋白浓度计算

活性单位定义：37℃ 每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol 4-硝基苯胺为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{糜蛋白酶 (U/mg prot)} &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 10^9 \\ &= 454 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

（2）按样本质量计算

活性单位定义：37℃ 每克样品每分钟催化产生 1nmol 4-硝基苯胺为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{糜蛋白酶 (U/g 鲜重)} &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 10^9 \\ &= 454 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

V 样：加入反应体系中粗酶液体积，0.02mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；V 反总：反应总体积，0.2mL； ϵ ：4-硝基苯胺摩尔消光系数，8800 L / mol / cm；d：96 孔板光径，0.5cm；T：反应时间，5min；W：样品质量，g；Cpr：粗酶液蛋白质浓度，mg/mL。