

糜蛋白酶（Chymotrypsin）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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：

紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃避光保存。临用前加入 50 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℃离心 10min，取上清，即粗酶液。

测定步骤：

1. 分光光度计预热 30min，调节波长到 237 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 37℃水浴中保温 30min。
3. 空白管：取 1mL 石英比色皿，加入 100μL 试剂一，1000μL 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 1mL 石英比色皿，加入 100μL 粗酶液，1000μL 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：

（1）按照蛋白浓度计算

活性单位定义：25℃每毫克蛋白每分钟催化吸光值增加 1 为一个酶活单位。

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

Cpr: 粗酶液蛋白质浓度（mg/mL），需要另外测定；V₁: 加入反应体系中粗酶液体积（mL），100μL=0.1 mL；V_{反应}: 反应总体积，1100μL=1.1mL；T: 反应时间（min），4min。

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：25℃每克样品每分钟催化吸光值增加 1 为一个酶活单位。

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

W: 样品质量 (g); V₁: 加入反应体系中粗酶液体积 (mL), 100μL=0.1 mL; V₂: 粗酶液总体积 (mL), 1 mL; V_{反总}: 反应总体积, 1100μL=1.1mL; 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。