

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。

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

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_{反总}: 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。

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

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。