

糜蛋白酶测试盒

50 管/24 样

一、测定意义:

糜蛋白酶又称胰凝乳蛋白酶(Chymotrypsin),系从牛或猪胰中提取的一种蛋白水解酶,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(酪氨酸、色氨酸、亮氨酸)或侧链大体积疏水性残基甲硫氨酸等。可以分解炎症部位纤维蛋白的凝结物,促进血凝块、脓性分泌物及坏死组织的溶化分解,从而净化创面,使肉芽组织新生,促进伤口愈合。其在眼科、皮肤科做临床局部应用已被肯定,也可用于创口或局部炎症,以减少局部分泌和水肿。近年来随着临床药理学研究的不断发展,其临床应用范围也日渐广泛。

二、测定原理:

以酪蛋白为底物,糜蛋白酶可水解蛋白产生含酚的氨基酸,而酚试剂可被含酚的氨基酸还原成蓝色物质,通过比色可测定糜蛋白酶活力。

三、试剂盒组成与配制:

试剂一: 液体 24mlX1 瓶, 4℃保存 3 个月。

试剂二: 液体 6mlX2 瓶, 4℃保存 1 个月。

试剂三: 液体 100mlX1 瓶, 4℃保存 3 个月。

试剂四: 液体 9mlX2 瓶, 4℃避光保存 2 个月。

试剂五: 1mg/ml 酪氨酸标准品贮备液 1mlX1 瓶, 标准品稀释液 20mlX1 瓶, 4℃保存 1 个月。50ug/ml 标准应用液的配制:取 1mg/ml 标准品贮备液 50ul 用标准品稀释液稀释至 1ml,即 1: 19 (体积比)稀释,充分混匀后, 4℃保存 10 天以上。

试剂六: 匀浆介质 60mlX2 瓶, 4℃保存 1 个月。

四、操作步骤:

1、样本前处理:

组织样本: 准确称取组织重量, 按重量(g):体积(ml)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的匀浆介质, 冰水浴条件下机械匀浆, 制成 10%的组织匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟,

取上清液进行预试后根据活力大小或直接进行检测或用匀浆介质进行适当稀释后测定。(预试结果请参考附录中的标准曲线)

2、样本及试剂在测试前均要平衡至室温(室温在 20C 以上可放置室温:室温在 20C 以下, 可将试剂置于 37C 水浴中预温 10 分钟)。

3、操作表:

① 酶促反应:

	测定管	对照管
样本(ml)	0.04	0.04
37℃水浴预温 2 分钟		
试剂一(ml)		0.4
试剂二(ml)		0.20
充分混匀, 37℃准确水浴 10 分钟		
试剂一(ml)	0.4	

充分混匀, 37℃水浴 10 分钟,3500 转/分离心 10 分钟, 取上清 0.3ml 显色反应

② 显色反应:

	空白管	标准管	测定管	对照管
标准品稀释液(ml)	0.3			
50ug/ml 标准应用液(ml)		0.3		
上清(ml)			0.3	0.3
试剂三(ml)	1.5	1.5	1.5	1.5
试剂四(ml)	0.3	0.3	0.3	0.3

充分混匀，37℃水浴 20 分钟后取出，660nm,1cm 光茎，蒸馏水调零，比色

注：对照管因不同的样本之间有差距，所以要求每只样本都要做对照管，而标准管及空白管只需要 1—2 只

四计算公式及举例：

组织中糜蛋白酶活力的计算

①定义：每毫克组织蛋白 37℃每分钟分解蛋白生成 1ug 氨基酸相当于 1 个酶活力单位

(1 个酶活力单位=1ug 酪氨酸/分钟/组织蛋白)

② 计算公式

糜蛋白酶活力=测定 OD 值-对照 OD 值 X 标准品浓度 ÷ 反应时间 X 反应液总体积(0.64ml) ÷ 待测样本蛋白浓度

(U/mgprot) = 标准 OD 值-空白 OD 值 X (50ug /ml) ÷ (10min) X 取样量(0.04ml) ÷ (mgprot/ ml)