（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K845-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(400-410 nm)

Elabscience®胰凝乳蛋白酶比色法测试盒

Chymotrypsin Activity Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测组织样本中的胰凝乳蛋白酶的活力。

检测原理

胰凝乳蛋白酶(Chymotrypsin)是一种由胰腺分泌的丝氨酸蛋白酶，主要作用是在消化过程中分解蛋白质。它专门水解蛋白质中芳香族氨基酸(如苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)肽键，从而生成较小的多肽或氨基酸，便于机体进一步吸收。此外，胰凝乳蛋白酶也广泛应用于实验室中的蛋白质分析和研究，尤其是用于蛋白质序列测定和结构分析。

本试剂盒检测原理：底物经过胰凝乳蛋白酶催化后转化为有颜色的物质，在波长 405 nm 处检测 OD 值，通过标准品 OD 值计算酶活。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。(货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	0.5 mL×1 支	1 mL×1 支	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	5 mmol/L 标准品溶液 (5 mmol/L Standard Solution)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×2 支	-20ºC 避光保存 6 个月
	酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(400-410 nm，最佳检测波长 405 nm)、恒温箱

试剂：生理盐水(0.9%NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(25 ℃)。

② 工作液配制：

将试剂二：试剂一按体积比=1：24配制，避光待用，现配现用，当天使用有效。

③ 1 mmol/L标准品配制：

将试剂三：试剂一=1：4配制，避光待用，现配现用。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	**0**	**0.2**	**0.3**	**0.4**	**0.6**	**0.7**	**0.8**	**1**
1 mmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	120	140	160	200
试剂一(μL)	200	160	140	120	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量(g)：生理盐水(0.9%NaCl)体积(mL)=1：9的比例匀浆，4ºC，10000 ×g离心10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.028-1.01 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠小肠组织	40-50	10%小鼠胰腺组织	5-10
10%小鼠肝组织	5-10		

注：稀释液为生理盐水(0.9%NaCl)。

操作步骤

① 标准孔:取 20 μL 不同浓度的标准品溶液,分别加入相应的酶标孔中。测定孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

② 向步骤①中各孔加入 180 μL 工作液。

③ 振板 5 s，酶标仪 405 nm 波长下检测测定孔 OD 值 A_1。37 ℃ 孵育 30 min 后检测各孔 OD 值 A_2，标准曲线以标准孔 A_2 值进行拟合。

操作表

	标准孔	**测定孔**
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
工作液(μL)	180	180
振板 5 s，酶标仪 405 nm 波长下检测测定孔 OD 值 A_1。37 ℃ 孵育 30 min 后检测各孔 OD 值 A_2，标准曲线以标准孔 A_2 值进行拟合。		

本试剂盒检测样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax + b

组织样本中胰凝乳蛋白酶活力计算公式：

定义：37℃ 条件下，每克组织样本蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶活为一个活力单位。

$$\text{胰凝乳蛋白酶活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{405} - b) \div a \div T \times f \div C_{pr} \times 1000$$

注解:

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值，标准曲线以标准孔 A_2 值进行拟合)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔA_{405}：样本测定孔变化 OD 值：$\Delta A_{405} = A_2 - A_1$

T：反应时间 30 min

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度，gprot/L

1000：单位换算，1 mmol/L=1000 μmol/L

附录1 关键数据

1.技术参数

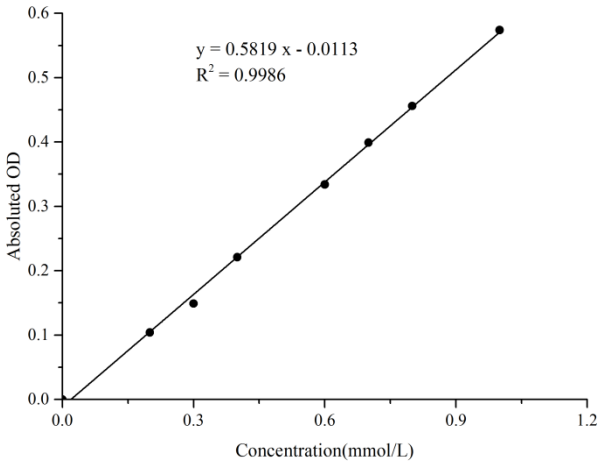
检测范围	0.028-1.01 U/L	**批间差**	1.2-9.7%
灵敏度	0.028 U/L	**批内差**	1.8-4.0%
稀释回收率	95-102%		

2.标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	**0**	**0.2**	**0.3**	**0.4**	**0.6**	**0.7**	**0.8**	**1**
A_2	0.077	0.182	0.226	0.302	0.415	0.475	0.536	0.639
	0.078	0.182	0.227	0.299	0.412	0.477	0.534	0.652
平均 A_2 值	0.078	0.182	0.227	0.300	0.414	0.476	0.535	0.646
绝对 A_2 值	0	0.104	0.149	0.221	0.334	0.399	0.456	0.574

② 绘制标曲(如下图)：



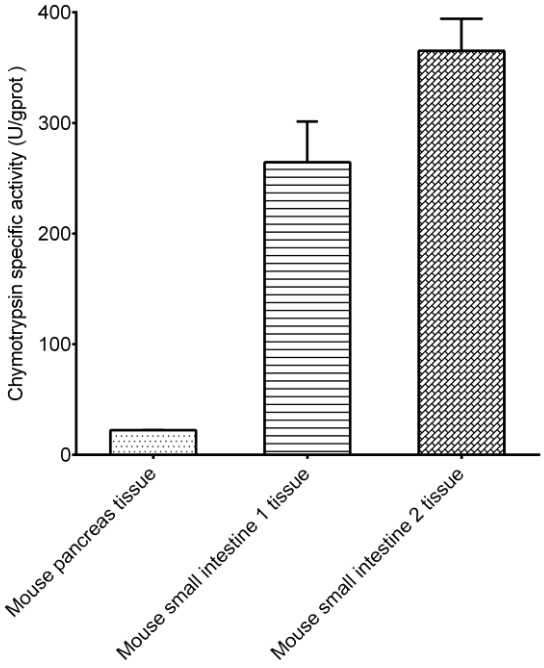
附录2 实例分析

例如小鼠小肠组织 (数据仅供参考):

取20 μL稀释50倍的10%小鼠小肠组织样本加入到酶标板孔中，按操作表操作，结果如下：标准曲线为y = 0.5819 x - 0.0113，测定孔A_1值为0.107，A_2为0.521，$\Delta A_{405}= A_2 - A_1 = 0.521 - 0.107 = 0.414$，测定出10%小鼠小肠组织样本的蛋白含量为4.97 gprot/L，计算结果为：

$$\text{胰凝乳蛋白酶活力(U/gprot)} = (0.414 + 0.0113) \div 0.5819 \div 30 \times 50 \div 4.97 \times 1000$$
$$= 245.1 \text{ U /gprot}$$

按说明书操作，测定小鼠胰腺组织(10%组织匀浆蛋白浓度为13.18 gprot/L，稀释倍数为5，加样量20 μL)、小鼠小肠组织1(10%组织匀浆蛋白浓度为4.97 gprot/L，稀释倍数为50，加样量20 μL)、小鼠小肠组织2(10%组织匀浆蛋白浓度为7.27 gprot/L，稀释倍数为50，加样量20 μL)中的胰凝乳蛋白酶活力(如下图)：



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。