

菠萝蛋白酶检测试剂盒(福林微板法)

产品简介:

菠萝蛋白酶(Bromelain)简称菠萝酶,亦称凤梨酶、凤梨酵素等,是存在于菠萝植株中的蛋白水解酶,可从菠萝果茎、叶、皮提取出来,经精制、提纯、浓缩、酶固定化、冷冻干燥而得到,菠萝蛋白酶已被广泛应用于食品、医药等行业,利用吸附力、离子键、共价键等不同的联结方式,将酶与不溶性载体联结制成固定化酶,可以很好的避免酶的失活,易于储存运输。

Leagene 菠萝蛋白酶检测试剂盒(福林微版)检测原理是通过菠萝蛋白酶催化底物酪蛋白水解生成酪氨酸,酪氨酸含有酚羟基,可与福林试剂发生福林反应,即福林试剂在碱性条件下容易定量的被酚类化合物还原,生成钨蓝和钼蓝的混合物呈现不同深浅的蓝色,于酶标仪 680nm 处检测吸光度,吸光度的大小与酪氨酸含量的多少有关,吸光度大说明酪氨酸含量高,也就是说菠萝蛋白酶分解的酪蛋白多,酶活性高,主要用于检测植物组织尤其是菠萝匀浆液中菠萝蛋白酶的活性。该试剂盒仅用于科研领域,不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

名称	编号	TE0441	Storage
		100T	
试剂(A): 组织匀浆液		500ml	RT
试剂(B): Bromelain Lysis Buffer		500ml	RT
试剂(C): Bromelain 洗脱液		100ml	4°C
试剂(D): 酪蛋白溶液		10ml	4°C
试剂(E): 酪蛋白终止液		30ml	RT 避光
试剂(F): 酪氨酸标准(0.1mg/ml)		1ml	4°C 避光
试剂(G): Bromelain Assay Buffer		20ml	RT
试剂(H): 福林试剂		4ml	4°C 避光
使用说明书		1 份	

自备材料:

- 1、蒸馏水
- 2、研钵或匀浆器、离心管、试管、低温离心机
- 3、水浴锅或恒温箱、酶标板、酶标仪

操作步骤(仅供参考):
1、准备样品:

- ①植物样品: 取 10g 菠萝肉或植物组织, 切碎后在研钵或匀浆器中加入等体积组织匀浆液进行研磨或匀浆, 4°C 静置 30min, 滤纸或 4~6 层纱布过滤, 留取滤液, 边搅拌边加入 10ml Bromelain Lysis Buffer, 搅拌约 10min, 4°C 静置 1h, 4°C 4000r/min 离心 7~10min, 弃上清液, 收集沉淀, 加入 2~3 倍体积的 Bromelain 洗脱液, 搅拌洗脱 20min; 再次 4°C 4000r/min 离心 7~10min, 取上清液, -20°C 冻存, 用于菠萝蛋白酶的检测。
- ②固定化酶: 称取适量的固定化酶, 溶解于 0.5ml 组织匀浆液, 混匀, -20°C 冻存待用。
- ③高活性样品: 如果样品中含有较高活性的菠萝蛋白酶, 可以使用蒸馏水或组织匀浆液进行恰当的稀释。

- 2、处理待测样品: 取两支离心管, 按下表顺序依次操作。含有测定液和对照液的离心管室温放置 15min, 3000r/min 离心 7~10min, 分别取上清液待用。

单位: ml	样品对照孔
待测样品(提前 40°C 孵育)	0.1
酪蛋白终止液(提前 40°C 孵育)	0.3
摇匀灭活。	
酪蛋白溶液(提前 40°C 孵育)	0.1
混匀后 40°C 准确孵育 10min。	

单位: ml	样品测定孔
待测样品(提前 40°C 孵育)	0.1
酪蛋白溶液(提前 40°C 孵育)	0.1
混匀后 40°C 准确孵育 10min。	
酪蛋白终止液(提前 40°C 孵育)	0.3
摇匀灭活。	

- 3、稀释系列酪氨酸标准: 取适量的酪氨酸标准(0.1mg/ml), 按下表配制不同浓度的酪氨酸标准备用。

加入物质(μl)	1	2	3	4	5
酪氨酸标准(0.1mg/ml)	10	20	30	40	50
蒸馏水	40	30	20	10	0
酪氨酸浓度(mg/ml)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1

- 4、Bromelain 加样: 取 96 孔板, 按照下表设置空白孔、标准孔、样品对照孔、样品测定孔, 溶液应按照顺序依次加入, 并注意避免产生气泡; 如果样品中的酶活性过高, 可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定, 样品的检测最好能设置 2 平行管, 求平均值。

加入物质(μl)	空白孔	标准孔	样品对照孔	样品测定孔
蒸馏水	35	—	—	—
系列酪氨酸标准(1~5号)	—	35	—	—
对照液	—	—	35	—
测定液	—	—	—	35
Bromelain Assay Buffer	175	175	175	175
福林试剂	35	35	35	35

5、Bromelain 测定: 充分混匀, 40°C 孵育显色 15min, 以对照孔调零, 酶标仪测定 680nm 处测定孔的吸光度; 同时以空白孔调零, 酶标仪测定 680nm 处系列酪氨酸标准(1~5号)孔的吸光度。

计算: 以系列酪氨酸标准(1~5号)浓度(mg/ml)为横坐标, 对应的吸光度值为纵坐标, 绘制酪氨酸标准曲线, 通过样品测定管的吸光度, 在标准曲线上查得各测定孔中酪氨酸浓度。菠萝蛋白酶活性单位的定义: 在 40°C pH7.0 时, 每分钟水解酪蛋白产生 1μg 酪氨酸所需的酶量为一个活性单位; 其比活力定义: 每毫克蛋白所含蛋白酶活力单位的数量。

$$\text{菠萝蛋白酶(U)} = (\text{测定液的酪氨酸浓度} \times 1000) / 15$$

式中: 测定管的酪氨酸浓度单位为 mg/ml

1000=μg 与 mg 的单位换算

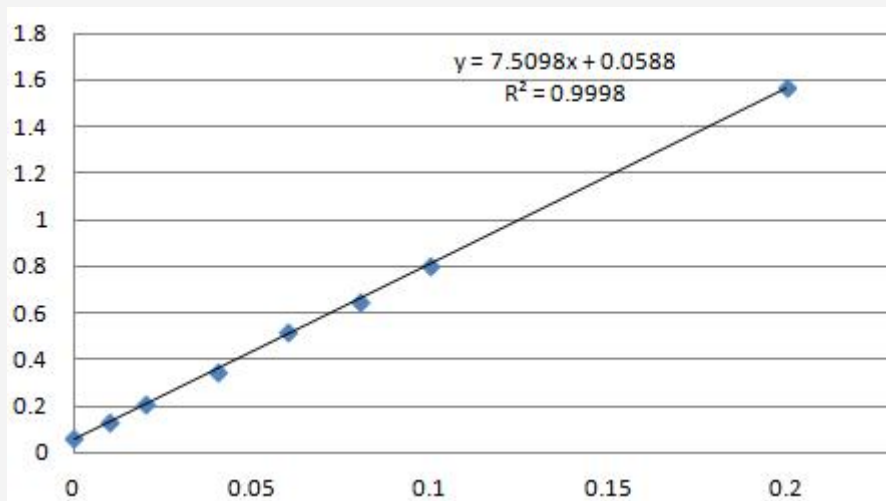
15=孵育时间 15min

注意事项:

- 1、待测样品中不能含有酶抑制剂, 同时需避免反复冻融。
- 2、菠萝蛋白酶提取时, 注意低温操作, 防止酶活性, 亦可-20°C保存。
- 3、如果没有酶标仪, 也可以使用分光光度计测定, 每次检测指标不宜过多, 否则操作时间不一, 有可能导致样本间的差异。
- 4、离心时最好采用低温离心机, 常温离心机也可。
- 5、酪蛋白终止液有一定腐蚀性, 请小心操作。
- 6、试剂开封后请尽快使用, 以防影响后续实验效果。
- 7、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期: 6个月有效; 低温运输, 按要求保存。

附录：标准曲线制作：Leagene 参考说明书操作，用酶标仪 630nm 对系列酪氨酸标准(0、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.20mg/ml)进行吸光度的测定，其标准曲线如下(仅供参考)：



注意：由于检测仪器和操作手法等条件的不同，标准曲线会有差异，该值仅供参考，根据 Leagene 测定经验显示酪氨酸标准浓度在 0.002mg/ml 以下，0.30mg/ml 以上，标准曲线会有偏差。

相关产品：

产品编号	产品名称
CC0007	磷酸缓冲盐溶液(10×PBS,无钙镁)
CM0004	LB 培养基
DC0032	Masson 三色染色液
DF0135	组织细胞固定液(4% PFA)
DP0013	GUS 染色液(即用型)
NR0001	DEPC 处理水(0.1%)
PT0001	BCA 蛋白定量试剂盒
TC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)