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。

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:

编号 / 名称	GCTE0441 100T	Storage
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℃
试剂(D): 酪蛋白溶液	10ml	4℃
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℃ 避光
试剂(G): Bromelain Assay Buffer	20ml	RT
试剂(H): 福林试剂	4ml	4℃ 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℃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℃静置 1h，4℃ 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℃ 4000r/min 离心 7~10min，取上清液，-20℃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℃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℃孵育)	0.1
酪蛋白终止液(提前 40℃孵育)	0.3
摇匀灭活。	
酪蛋白溶液(提前 40℃孵育)	0.1
混匀后 40℃准确孵育 10min。	

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

菠萝蛋白酶(U)=(测定液的酪氨酸浓度×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℃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。

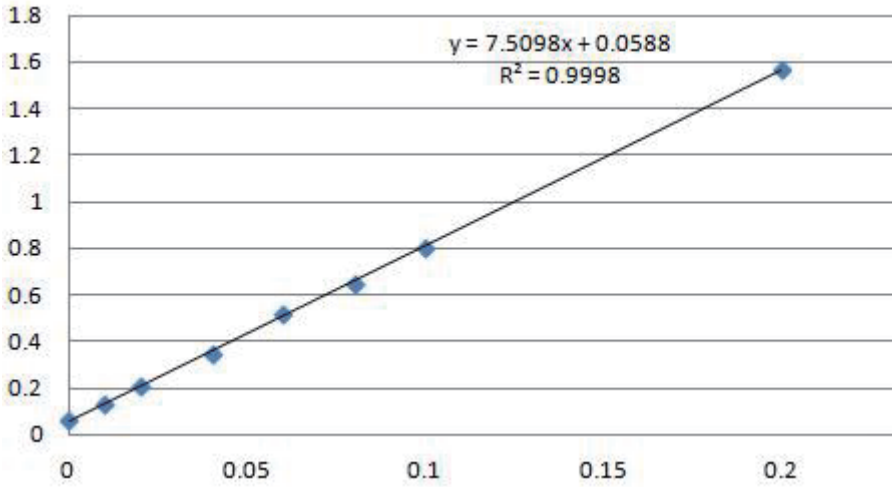
5、酪蛋白终止液有一定腐蚀性，请小心操作。

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：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
GCCC0007	磷酸缓冲盐溶液(10×PBS,无钙镁)
GCCM0004	LB 培养基
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDF0135	组织细胞固定液(4% PFA)
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCNR0001	DEPC 处理水(0.1%)
GCPT0001	BCA 蛋白定量试剂盒
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)