



羧肽酶A（牛胰）检测

1.定义

1.1 纯水=来自去离子系统的水，25 °C条件下电阻率 $\geq 18\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$

1.2. 羧肽酶A单位定义 – 在pH 3.5、温度25 °C条件下，一个单位每分钟可水解1.0 μmole 马尿酸-L-苯丙氨酸。

2.讨论

羧肽酶A

马尿酸-L-苯丙氨酸 $\longrightarrow$ 马尿酸+苯丙氨酸

3.操作流程

3.1 条件:

T = 25°C, pH = 3.5, A254nm, 光程= 1 cm

3.2 方法:

连续光谱法速率测定

3.3 试剂:

3.3.1 25 mM Tris HCl 缓冲液，含500 mM 氯化钠，pH 3.5，25 °C（缓冲液）
采用纯水，制备含3.03 mg/mL Trizma碱、29.2 mg/mL氯化钠的溶液。采用1 N盐酸在25 °C下降pH调整至3.50。在室温下保存溶液。

3.3.2 1.0 mM马尿酸-L-苯丙氨酸溶液(Hippuryl-L-Phe)

采用200 Proof乙醇制备含32.6 mg/mL马尿酸-L-苯丙氨酸的溶液。样品一旦完全溶解到乙醇中时，采用试剂3.3.1（缓冲液）进一步稀释到0.326 mg/mL。请勿调节此溶液的pH。在室温下储存溶液，并在制备后三小时内使用。

3.3.3 1.0 M 氯化钠溶液（酶稀释液）

采用纯水制备含58.4 mg/mL氯化钠的溶液。在室温下保存溶液。

羧肽酶A溶液（酶）

3.3.4.1 使用前，在室温下现配含有4-8 units/mL羧肽酶A的试剂3.3.3（酶稀释液）。



3.3.4.2 请勿采用低温试剂3.3.3稀释酶。

3.3.4.3 每一等份样品均需采用试剂3.3.3（酶稀释液）配制新鲜稀释液。

3.3.4.4 针对每份样品单独稀释，并再次确认来自同一容器或批次的等份样品一致。

3.3.4.5 倾倒样品前，务必振荡样品，确认所有沉到管底的材料均为均质溶液。

3.4 操作步骤

3.4.1 一次运行一等份，因为最大速率通常出现在第一分钟。

3.4.2 针对试剂3.3.2提供光谱分析空白样。由于试剂 3.3.2具有高吸光度，检测需要在精确度高于吸光度2.0的情况下运行。

3.4.3 将以下成分加入到适宜的石英培养皿中：

	试样	空白样
Hippuryl-L-Phe（试剂3.3.2）	2.90	2.90

3.4.4 使用适宜的恒温光谱分析仪调整至25 °C，然后加入以下成分(ml)

酶稀释液(试剂3.3.3)	-----	0.10
酶(试剂3.3.4)	0.10	-----

3.4.5 倒置混匀，然后记录大约5分钟内在254nm出的吸光度。获取一分钟时间间隔内试样和空白反应物的最快线性速率($\Delta A_{254nm}/min$)。为保证数据有效，每次反应的 $\Delta A_{254nm}/min$ 必须处于0.05至0.1之间。

3.5 计算

$$(\Delta A_{254nm}/min \text{ 试样} - \Delta A_{254nm}/min \text{ 空白样}) (3.00)(df)$$

$$3.5.1 \text{ 单位/mL 酶} = \frac{\quad}{(0.36)(0.10)}$$

$$3.5.2 \text{ 单位/mg 固体} = \frac{\text{单位/mL 酶}}{\text{mg 固体/mL 酶}}$$



$$3.5.3 \text{ 单位/mg 蛋白} = U \frac{\text{单位/mL 酶}}{\text{mg蛋白/mL酶}}$$

3.00 = 测定的总体积 (ml)

df = 稀释系数

0.36 = 马尿酸在254 nm处的毫摩消光系数

0.10 = 所用的酶体积(ml)

3.6 最终测定体系浓度:

在3.00 mL反应混合物中, 终浓度为24 mM Tris、0.96% 乙醇、0.97 mM马尿酸-L-苯丙氨酸、512 mM氯化钠和0.4-0.8单位羧肽酶A。



源叶