



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

菠萝蛋白酶检测试剂盒(福林微板法)

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。

源叶生物 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。

组成:

名称 \ 编号	R30315 100T	Storage
试剂(A): 组织匀浆液	500ml	4℃
试剂(B): Bromelain Lysis Buffer	500ml	4℃ 避光
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、研钵或匀浆器
- 2、离心管、离心机、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。	



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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; 如果样品中的菠萝蛋白酶活性过高, 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。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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。

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

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:

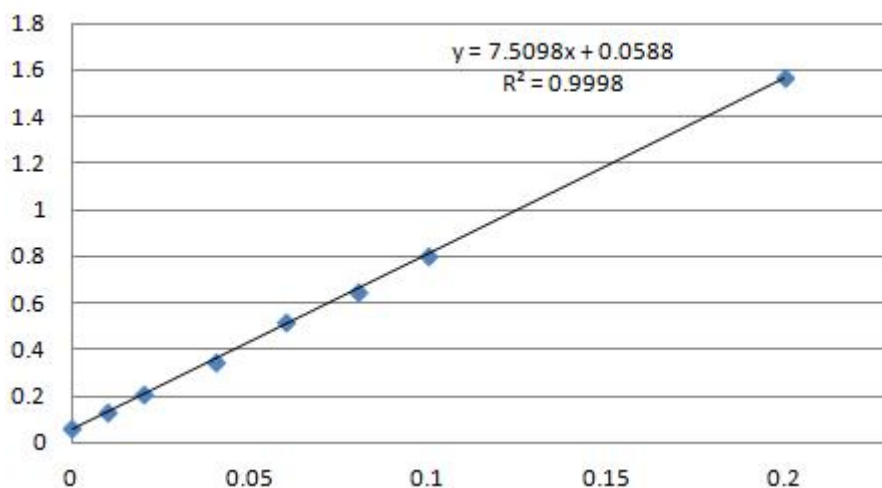
- 1、待测样品中不能含有酶抑制剂, 同时需避免反复冻融。
- 2、菠萝蛋白酶提取时, 注意低温操作, 防止酶活性, 亦可-20℃保存。
- 3、如果没有酶标仪, 也可以使用分光光度计测定, 每次检测指标不宜过多, 否则操作时间不一, 有可能导致样本间的差异。
- 4、离心时最好采用低温离心机, 常温离心机也可。
- 5、酪蛋白终止液有一定腐蚀性, 请小心操作。
- 6、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期: 6个月有效; 4℃运输, 4℃保存。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

附录：标准曲线制作：源叶生物参考说明书操作，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。