胰蛋白酶活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHC7-C24	胰蛋白酶活性检测试剂盒	24T	常量法
AYHC7-C48		48T	

一、测定意义：

胰蛋白酶（Trypsin，EC 3.4.4.4）选择性水解变性蛋白质中由赖氨酸或精氨酸的羧基所构成的肽链，是一种重要的消化酶。此外，胰蛋白酶还广泛应用于脓胸、血胸、外科炎症、溃疡、创伤性损伤等所产生的局部水肿、血肿及脓肿等的辅助治疗。

二、测定原理：

胰蛋白酶可以水解碱性氨基酸的羧基所生成的肽键、酰胺键和酯键。根据胰蛋白酶水解酰胺键的性质设置底物，且底物与其产物对405nm波长的光基本不吸收，因此本实验测定光波的波长设定在405nm上，记录吸光度的变化。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(24T)	试剂装量(48T)	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 21mL×1 瓶	液体 42mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	-20℃保存
工作液配置：试剂一：试剂二=7:10，配完后混合均匀 5min 再加入样本中。			
试剂三	液体 5mL×1 瓶	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存

四、操作步骤：

样本前处理

1、组织：按照组织质量（g）:提取液(mL)为1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。

测定步骤

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至405nm，蒸馏水调零；
2. 测定前将试剂恢复至常温；
3. 操作表：

	测定管	对照管
样品（μL）	50	-
水（μL）	-	50

工作液（μL）	850	850
准确反应 2min		
试剂三（μL）	100	100
静置 2min，于 405nm 读数。测定 405nm 处吸光值，分别记为 $A_{对照}$、$A_{测定}$。$\Delta A=A_{测定}-A_{对照}$。每个测定管需设一个对照管。		

五、胰蛋白酶活性计算：

1. 组织、细胞样本胰蛋白酶计算

(1) 按样本质量计算：

单位定义： 每克组织每分钟消耗 1μmol 对硝基苯胺为一个酶活力单位。

胰蛋白酶（nmol/min/g 鲜重）=[△A×V 反总÷（ε×d）×10^6]÷（V 样÷V 样总×W）÷T

(2) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克蛋白每分钟消耗 1μmol 对硝基苯胺 为一个酶活力单位。

胰蛋白酶（nmol/min/mg prot）=[△A×V 反总÷（ε×d）×10^6]÷（V 样×Cpr）÷T

V 反总：反应体系总体积，1×10^{-3} L；
ε：NADH 摩尔消光系数，9.87×10^3L/mol/cm；
d：比色皿光径，1cm；
V 样：加入样本体积，0.05mL；
V 样总：加入提取液体积，1mL；
T：反应时间，2min；
Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；
10^6：单位换算系数，1mol=10^6μmol；
W：样本质量，g；

六、 注意事项：

实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。