

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-M48	胰蛋白酶活性检测试剂盒	48T	微量法
AYHC7-M96		96T	

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(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 110mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 7mL×1 瓶	液体 14mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 10mL×1 瓶	液体 20mL×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 2mL×1 支	液体 4mL×1 支	2-8℃保存

注：试剂二使用前先 37℃预热 10min。

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. 酶标仪预热 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)	10	-
水 (μL)	-	10
工作液 (μL)	170	170
准确反应 2min		
试剂三 (μL)	20	20
静置 2min, 于 405nm 读数。测定 405nm 处吸光值, 分别记为 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ 。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。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。

$$\text{胰蛋白酶 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$$

(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。

$$\text{胰蛋白酶 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

V 反总: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L;

ε: NADH 摩尔消光系数, 9.87×10^3 L/mol/cm;

d: 比色皿光径, 1cm;

V 样: 加入样本体积, 0.01mL;

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, $1\text{mol} = 10^6\mu\text{mol}$;

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。