

胰蛋白酶活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照说明书操作。

货号：BC2310

规格：50T/48S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一 A	液体 140 μL×1 支	-20℃保存
试剂一 B	液体 4 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 0.55 mL×1 支	2-8℃保存
试剂三	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

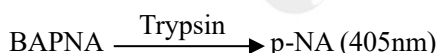
溶液的配制：

- 1、试剂一工作液：实验前按试剂一 A：试剂一 B=30μL：630μL（660μL，约 13T）配制成试剂一工作液，2-8℃可保存 4 周。
- 2、试剂二：试剂放于试剂瓶内 EP 管中。由于试剂二遇冷凝固，使用时请提前在室温下放置一段时间使其充分溶解（可提前分装保存），使用前先将液体甩离至管底部（使用掌上离心机即可）。
- 3、试剂二工作液：实验前取部分试剂三单独置于 37℃水浴预热 10min 以上，加样前按试剂二：试剂三=0.09mL：8.91mL（9mL，约 10T）配制成试剂二工作液，加样前再根据样本量现用现配，不做保存。
- 4、标准品：5μmol/mL 对硝基苯胺标准品。
- 5、0.08μmol/mL 标准品的配制：取 50μL 5μmol/mL 标准品，加入 200μL 试剂三，配制成 1μmol/mL 标准品溶液；再取 80μL 1μmol/mL 标准品溶液，加入 920μL 试剂三，配制成 0.08μmol/mL 标准品溶液，现用现配。

产品说明：

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。

胰蛋白酶催化底物 BAPNA 生成对硝基苯胺(p-NA)，该物质在 405nm 波长下有特征吸收峰。由于 p-NA 的吸收度值与含量成正比，通过测定单位时间内产生的 p-NA 能够计算胰蛋白酶的酶活性大小。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。





操作步骤:

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。10000 rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

1、可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。

2、试剂三单独置于 37℃水浴预热 10min 以上，并在加样前配制试剂二工作液（现用现配，不做保存）。

3、加样表

试剂（μL）	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	100	-	-	-
提取液	-	100	-	-
试剂一工作液	50	50	-	-
试剂二工作液	850	850	-	-
标准品	-	-	1000	-
试剂三	-	-	-	1000
加入试剂二工作液的同时开始计时，充分快速混匀后并测定 30s 时在 405nm 处的吸光值 A ₁ ，于 37℃环境反应 1h，迅速测定 1h 30s 时的吸光值 A ₂ 。计算 $\Delta A_{\text{测定}} = (A_{2\text{测定}} - A_{1\text{测定}}) - (A_{2\text{对照}} - A_{1\text{对照}})$ 。对照管只需测定 1-2 次。 可直接在比色皿中加入上述试剂，A ₁ 测定完成后转移至 EP 管中进行反应。			直接测定 405nm 处的吸光值，分别记为 A _{标准} 和 A _{空白} ，计算 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。标准管和空白管只需测定 1-2 次。	

三、胰蛋白酶活性计算

（1）按照样本蛋白浓度计算

活性单位定义：每毫克组织蛋白每小时催化生成 1μmol 对硝基苯胺为一个活性单位。

胰蛋白酶活性（U/mg prot）= $\Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{反应}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 0.8 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$

（2）按照样本质量计算

活性单位定义：每克组织每小时催化生成 1μmol 对硝基苯胺为一个活性单位。

胰蛋白酶活性（U/g 质量）= $\Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提}}) \div T \times F = 0.8 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$

$C_{\text{标准}}$ ：标准管对硝基苯胺浓度，0.08μmol/mL； $V_{\text{反应}}$ ：反应总体积，1mL； C_{pr} ：样本蛋白浓度（mg/mL），需要另外测定； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中样本体积，0.1mL； T ：反应时间，1h； $V_{\text{提}}$ ：加入提取液体积，1 mL； W ：样本质量，g； F ：样本稀释倍数。

注意事项：

1. 实验前用 1~2 个样做预实验，保证 $\Delta A_{\text{测定}}$ 在 0.01~0.8 之间；若 $\Delta A_{\text{测定}} > 0.8$ ，建议将样本用提取液适当稀释后再进行测定，若 $\Delta A_{\text{测定}} < 0.01$ ，可加大操作表中样本加样量（同时减少试剂二工作液的体积）。注意同步修改计算公式。

2. 实验实例：





- 1、取 0.1037g 大鼠胰脏，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆，离心后上清使用提取液稀释 2 倍，按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = (A_{2\text{测定}} - A_{1\text{测定}}) - (A_{2\text{对照}} - A_{1\text{对照}}) = (1.55 - 0.605) - (0.303 - 0.192) = 0.834$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.704 - 0.003 = 0.701$ ，按样本质量计：
胰蛋白酶活性 (U/g 质量) = $0.8 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 18.356 \text{ U/g}$ 。

参考文献：

- [1] V. Kuzmina, N. V. Ovchinnikova, and S. M. Tolpygo. Serum Activity of Proteolytic Enzyme Trypsin in Rats under Conditions of Water and Food Deprivation[J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2023, 175(5): 540-544.

相关系列产品：

BC2280/BC2285 酸性蛋白酶 (ACP) 活性检测试剂盒

BC2290/BC2295 中性蛋白酶 (NP) 活性检测试剂盒

BC2320/BC2325 胃蛋白酶活性检测试剂盒

BC2330/BC2335 糜蛋白酶活性检测试剂盒

