

上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 胰蛋白酶 (Trypsin) 试剂盒说明书

### 微量法

**注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。**

测定意义：

胰蛋白酶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。

测定原理：

胰蛋白酶催化水解BAEE的酯键，生成BA，BA在253nm处有吸收峰，通过测定253nm吸光度增加速率，即可计算出胰蛋白酶的活性。

自备仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板(UV板)、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃避光保存	临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解
试剂三	液体×1 瓶	4℃保存	-

粗酶液提取：

组织样品：按照组织质量 (g)：试剂一体积 (mL) 为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL试剂一）冰浴匀浆，8000g，4℃离心10min，取上清，即粗酶液。

测定：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到253nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二置于37℃水浴预热30min。
3. 空白管：取微量石英比色皿/96孔板，加入10 μL蒸馏水，20 μL试剂二，180 μL试剂三，迅速于253nm 测定0s 和60s 的吸光度A1和A2， $\Delta A_{\text{空白}} = A_2 - A_1$ 。
4. 测定管：取微量石英比色皿/96孔板，加入10 μL粗酶液，20 μL试剂二，180 μL试剂三，迅速于253nm 测定0s 和60s 的吸光度A3和A4， $\Delta A_{\text{测定}} = A_4 - A_3$ 。

胰蛋白酶活性计算公式：

**a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下**

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：37°C每毫克蛋白质每分钟催化253nm处吸光值增加1为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{胰蛋白酶 (U/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 21 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：37°C每克组织每分钟催化253nm处吸光值增加1为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{胰蛋白酶 (U/g)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 21 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W\end{aligned}$$

Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL)，需要另外测定；W: 组织质量 (g)；V1: 加入反应体系中粗酶液体积 (mL)，10  $\mu$ L=0.01 mL；V2: 粗酶液总体积 (mL)，1 mL；T: 反应时间 (min)，1min。

**b. 使用 96 孔板 (UV板) 测定的计算公式如下**

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：37°C每毫克蛋白质每分钟催化253nm处吸光值增加1为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{胰蛋白酶 (U/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 21 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：37°C每克组织每分钟催化253nm处吸光值增加1为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{胰蛋白酶 (U/g)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 21 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W\end{aligned}$$

Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL)，需要另外测定；W: 组织质量 (g)；V1: 加入反应体系中粗酶液体积 (mL)，10  $\mu$ L=0.01 mL；V2: 粗酶液总体积 (mL)，1 mL；V 反总: 反应总体积，0.21mL；T: 反应时间 (min)，1min。

注意事项：

1. 预实验保证吸光值变化在0.01~0.1之间。
2. 配制好的试剂二4°C保存，7天内使用完毕。