

## 胰蛋白酶 (Trypsin) 试剂盒说明书

货号：D100345

微量法 100T/96S

**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：

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 30 min，调节波长到 253 nm，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 10μL 蒸馏水，20μL 试剂二，180μL 试剂三，迅速于 253nm 测定 0s 和 60s 的吸光度 A1 和 A2， $\Delta A$  空白= A2-A1。
4. **测定管：**取微量石英比色皿/96 孔板，加入 10μL 粗酶液，20μL 试剂二，180μL 试剂三，迅速于 253nm 测定 0s 和 60s 的吸光度 A3 和 A4， $\Delta A$  测定= A4-A3。

### 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℃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℃每克组织每分钟催化 253nm 处吸光值增加 1 为 1 个酶活单位。

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

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)，10μL=0.01 mL；V2: 粗酶液总体积 (mL)，1 mL；T: 反应时间 (min)，1min。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：37℃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。

$$\text{胰蛋白酶 (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ = 21 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\text{胰蛋白酶 (U/g)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反总}} \div (\text{W} \times V1 \div V2) \div T \\ = 21 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{W}$$

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℃保存, 7 天内使用完毕。