

胃蛋白酶测试盒说明书

(货号: A080-1-1 测胃液、胃组织 50管/24样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

胃蛋白酶可水解蛋白产生含酚的氨基酸,而酚试剂可被含酚的氨基酸还原成蓝色物质,通过比色可测定胃蛋白酶活力。

二、试剂盒组成与配制: (试剂盒有效期 3 个月)

试剂一: 液体 24mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 液体 6mL×2 瓶, 4℃ 保存。

试剂三: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂四: 液体 9mL×2 瓶, 4℃ 避光保存。

试剂五: 1mg/mL 酪氨酸标准品贮备液 1mL×1 瓶, 标准品稀释液 20mL×1 瓶, 4℃ 保存。用前取 1mg/mL 标准品贮备液 50μL 用标准品稀释液稀释至 1mL, 即 1:19 (体积比) 稀释配成 50μg/mL 标准品应用液, 充分混匀后, 4℃ 可保存 10 天。

试剂六: 匀浆介质 60mL×2 瓶, 4℃ 保存。

三、所需仪器及试剂:

可见分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪 (660nm) 及 96 孔板), 涡旋混匀器, 离心机, 37℃ 水浴锅或恒温箱, 蛋白测定试剂 (组织样本用, 本公司有售)。

四、操作步骤:

1、样本前处理:

①、**胃液样本:** 取胃液 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液置冰上待测。先做预试, 再根据活力大小或直接取胃液进行检测或用匀浆介质适当稀释进行预试后再测。

②、**组织样本:** 准确称取组织重量, 按重量 (g): 体积 (mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的匀浆介质, 低温 (0-4℃) 条件下匀浆, 制成 10% 的组织匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液置冰上待测 (当天内有效)。实验前取 1-2 例进行预试后根据活力大小用匀浆介质进行适当稀释后再批量测定。

注: 预试结果以 $A_{测定} - A_{对照}$ 在 0.2 左右为宜, 若是 $A_{测定} - A_{对照}$ 的值不超过 0.02, 则可加完试剂二后的 37℃ 准确反应时间延长至 20 分钟或 30 分钟等)

2、操作表:

①、酶促反应:

	测定管	对照管
样本 (mL)	0.04	0.04
37℃ 水浴预温 2 分钟		
试剂二 (mL)	0.20	0.20
	混匀, 37℃ 准确反应 10 分钟	混匀后立即加试剂一
试剂一 (mL)	0.4	0.4
充分混匀, 37℃ 反应 10 分钟, 取出再次混匀, 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清 0.3mL 作显色反应		

②、显色反应:

	空白管	标准管	测定管	对照管
标准品稀释液 (mL)	0.3			
50μg/mL 标准品应用液 (mL)		0.3		
上清 (mL)			0.3	0.3
试剂三 (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5
试剂四 (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3
充分混匀, 37℃ 反应 20 分钟, 波长 660nm, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 分光光度计测定各管吸光度值 A (或是每管吸取 200μL 反应液加到 96 孔板中, 酶标仪 660nm 处读数)。				

[注]: 对照管因不同的样本之间有差异, 所以要求每只样本

都做对照管; 而标准管及空白管只需各做 1~2 个。

五、计算公式及举例:

1、胃液中胃蛋白酶活力的计算:

①、**定义:** 每毫升胃液 37℃ 每分钟分解蛋白生成 1μg 酪氨酸相当于 1 个酶活力单位。(1 个酶活力单位(U) = 1μg 酪氨酸/分钟/mL 胃液)

②、计算公式:

$$\text{胃蛋白酶活力 (U/mL)} = \frac{A_{测定} - A_{对照}}{A_{标准} - A_{空白}} \times C_{标准} \div T \times \frac{V_{反应}}{V_{样}} \times N$$

$C_{标准}$: 标准品浓度, 50μg/mL;

T : 反应时间, 10min;

$V_{反应}$: 反应液总体积, 0.64mL;

$V_{样}$: 取样量, 0.04mL;

N : 样本测试前稀释倍数。

2、组织中胃蛋白酶活力的计算:

①、**定义:** 每毫克组织蛋白 37℃ 每分钟分解蛋白生成 1μg 酪氨酸相当于 1 个酶活力单位。(1 个酶活力单位 = 1μg 酪氨酸/分钟/mg 组织蛋白)

②、计算公式:

$$\text{组织中胃蛋白酶活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{测定} - A_{对照}}{A_{标准} - A_{空白}} \times C_{标准} \div T \times \frac{V_{反应}}{V_{样}} \div C_{pr}$$

$C_{标准}$: 标准品浓度, 50μg/mL;

T : 反应时间, 10min;

$V_{反应}$: 反应液总体积, 0.64mL;

$V_{样}$: 取样量, 0.04mL;

C_{pr} : 组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

附录 I: 标准曲线计算法 (参考)

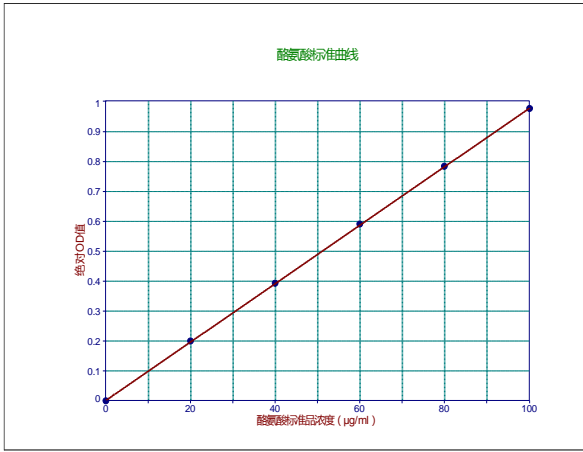
1、操作表:

管号	0	1	2	3	4	5
标准品稀释液 (mL)	0.3	0.24	0.18	0.12	0.06	
100μg/mL 酪氨酸标准 (mL)		0.06	0.12	0.18	0.24	0.3
试剂三 (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
试剂四 (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
充分混匀, 37℃ 反应 20 分钟, 波长 660nm, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测定各管吸光度 OD 值。						

2、检测结果:

管号	0	1	2	3	4	5
酪氨酸标准品浓度 (μg/mL)	0	20	40	60	80	100
测定 OD 值	0.016	0.217	0.410	0.607	0.800	0.993
绝对 OD 值	0.000	0.201	0.394	0.591	0.784	0.977

3、拟合标准曲线:



注：标准曲线用户可以不制作，如需制作，可按上表操作程序进行，则计算时可将 $A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 的值代入标曲计算后得到的数值代替前面计算公式中的 $\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$ ，而计算公式中其余项不变正常运算。