

## 胰蛋白酶 (Trypsin) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-D004-48 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

### 一、指标介绍:

胰蛋白酶(EC 3.4.4.4) 是蛋白酶的一种, 可以催化水解酰胺键。是一种重要的消化酶。

胰蛋白酶催化水解 N-苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基苯胺盐酸盐(BAPNA)生成对硝基苯胺, 后者在 405nm 有最大吸收峰, 通过测定吸光值升高速率即可得出胰蛋白酶的活性大小。

### 二、试剂盒组分与配制:

| 试剂组分 | 试剂规格         | 存放温度   | 注意事项                                   |
|------|--------------|--------|----------------------------------------|
| 试剂一  | 液体 50mL×1 瓶  | 4℃保存   |                                        |
| 试剂二  | 液体 1.2mL×1 支 | -20℃保存 | 1. 若凝固则可于 37℃水浴至融化;<br>2. 保质期与试剂盒效期相同。 |
| 标准品  | 粉体 1 支       | 4℃避光保存 | 1. 若重做标曲, 则用到该试剂;<br>2. 保质期与试剂盒效期相同。   |

### 三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、离心管、可见分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 1、样本提取:

##### ① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 生理盐水, 进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

##### ② 液体样本: 若是澄清液体, 直接检测, 若液体样本浑浊, 需 4℃×12000rpm, 离心 10min, 取上清液检测。

##### ③ 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 生理盐水, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 ( $10^4$ ): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

#### 2、检测步骤:

##### ① 打开紫外分光光度计, 设置温度 37℃ (若仪器无法控温, 则等待仪器过自检程序即可), 调节波长到 405 nm, 蒸馏水调零。

##### ② 所有试剂解冻至 37℃或 37℃水浴 15-30min。

##### ③ 反应 mix 制备: 试剂二若凝固则可于 37℃水浴至融化, 再按照试剂一: 试剂二=0.97mL: 0.03mL 混匀成反应 mix, 现配现用, 用多少量配制多少反应 mix。

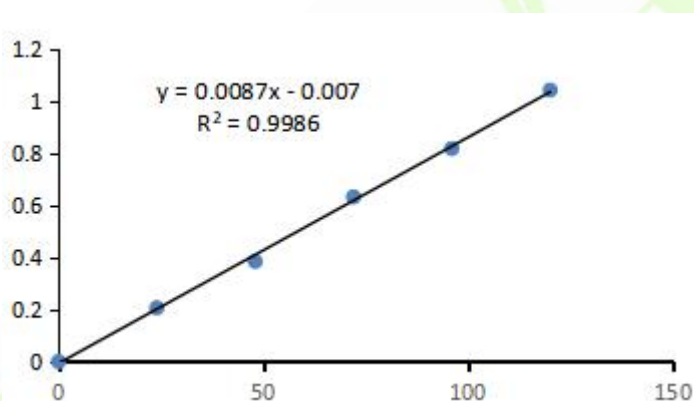
④ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

| 试剂组分 (μL)                                                              | 测定管 |
|------------------------------------------------------------------------|-----|
| 样本                                                                     | 120 |
| 反应 mix                                                                 | 680 |
| 混匀，立即于 405nm 处测定吸光值 A1，37°C 条件下反应 10min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。 |     |

【注】：若  $\Delta A$  在零附近徘徊，可以延长反应时间 T（如延长至 20min 后读取 A2）或增加样本量 V1（如增至 150μL，则反应 mix 相应减少），则改变后的 T 和样本量 V1 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0087x - 0.007$ ；x 为标准品(nmoL)，y 为  $\Delta A$ 。



2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

胰蛋白酶(nmol/min/g 鲜重) =  $[(\Delta A + 0.007) \div 0.0087] \div (W \times V1 \div V) \div T = 95.79 \times (\Delta A + 0.007) \div W$

3、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

胰蛋白酶(nmol/min/mg prot) =  $[(\Delta A + 0.007) \div 0.0087] \div (V1 \times Cpr) \div T = 95.79 \times (\Delta A + 0.007) \div Cpr$

4、按照液体体积计算：

单位定义：每毫升液体每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活单位 (U)。

胰蛋白酶(nmol/min/mL) =  $[(\Delta A + 0.007) \div 0.0087] \div V1 \div T = 95.79 \times (\Delta A + 0.007)$

5、按细胞数量计算：

单位定义：每  $10^4$  个细胞每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

胰蛋白酶(nmol/min/ $10^4$  cell) =  $[(\Delta A + 0.007) \div 0.0087] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.191 \times (\Delta A + 0.007)$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.12 mL；

W---样本质量，g；

500--细菌或细胞总数，500 万；

T---反应时间，10min；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒；

附：标准曲线制作过程：

1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。

- 2 制备标准品母液 (50 $\mu$ mol/mL)：临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底，加入 0.5mL 乙醇，涡旋震荡溶解后再加入 0.5mL 的蒸馏水混匀，得到 50 $\mu$ mol/mL 备用
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 $\mu$ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

|                                                                |     |     |     |     |     |     |
|----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 吸取标准品母液 100 $\mu$ L，加入 4.9mL 蒸馏水，混匀得到 1 $\mu$ mol/mL 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
| 标品浓度<br>$\mu$ mol/mL                                           | 0   | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 |
| 标品稀释液<br>uL                                                    | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL                                                           | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |
| 各标准管混匀待用。                                                      |     |     |     |     |     |     |

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。  
在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

| 试剂组分 ( $\mu$ L)     | 标准管 | 0 浓度管（仅做一次） |
|---------------------|-----|-------------|
| 标品                  | 120 |             |
| 蒸馏水                 |     | 120         |
| 试剂一                 | 680 | 680         |
| 混匀，于 405nm 处测定吸光值 A |     |             |