

胰蛋白酶 (Trypsin) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-D004 微板法 96 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 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 0.6mL×1 支	-20℃保存	若凝固则可于 37℃水浴至融化。
标准品	粉体 1 支	4℃避光保存	若重做标曲, 则用到该试剂。

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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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 酶标仪预热 30min (等待仪器过自检程序亦可), 设定波长到 405nm;

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。

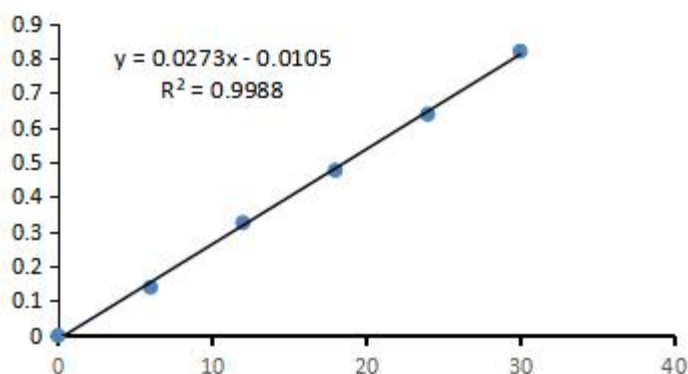
④ 在 96 孔板中按下表依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	30
反应 mix	170
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 ΔA 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 50μL，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： $y = 0.0273x - 0.0105$ ：x 为标准品(nmoL)，y 为 ΔA 。



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)=[$(\Delta A + 0.0105) \div 0.0273$] $\div (W \times V1 \div V) \div T = 122.1 \times (\Delta A + 0.0105) \div W$

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)=[$(\Delta A + 0.0105) \div 0.0273$] $\div (V1 \times Cpr) \div T = 122.1 \times (\Delta A + 0.0105) \div Cpr$

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)=[$(\Delta A + 0.0105) \div 0.0273$] $\div V1 \div T = 122.1 \times (\Delta A + 0.0105)$

5、按细菌/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)=[$(\Delta A + 0.0105) \div 0.0273$] $\div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.244 \times (\Delta A + 0.0105)$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.03 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 (50μmol/mL)：临用前 8000g 4°C 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 μ 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 μ 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 μ L，加入 4.9mL 蒸馏水，混匀得到 1 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
标品稀释液 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 96 孔板中按下表依次加入：

试剂组分 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	30	0
蒸馏水	0	30
试剂一	170	170
混匀，于 405nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{0 浓度}}$		