

胃蛋白酶 (Pepsin) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-D005 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

胃蛋白酶 (Pepsin) 是一种消化性蛋白酶, 由胃粘膜主细胞分泌, 分解食物中蛋白质成小肽段。一般用于神经性低酸症的鉴别, 慢性胃炎、慢性胃扩张、慢性十二指肠肠炎等症状时也会引起胃蛋白酶分泌的减少。

胃蛋白酶可催化血红蛋白水解生成含酚的氨基酸, 含酚的氨基酸与福林酚反应后显蓝色; 其颜色的深浅与胃蛋白酶活性呈正比。

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
提取液	液体 50mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 2 瓶	4°C避光保存	每瓶: 1. 临用前 8000g 4°C离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加 13mL 蒸馏水溶解备用 (保存周期与试剂盒有效期相同)。
试剂三	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 3mL×1 瓶	4°C避光保存	
标准品	粉体 1 支	4°C保存	1. 临用前 8000g 4°C离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加 2mL 提取液溶解, 作为标准品母液; 3. 将母液用蒸馏水稀释 10 倍 (100μl 母液 +900μl 蒸馏水), 即为 0.05mg/mL 酪氨酸。

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 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×3500rpm 离心 5min, 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:

液体用提取液按照 1:1 的比例混合稀释后，4°C×3500rpm，离心 5min，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 提取液，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）；4°C×3500rpm 离心 5min，取上清，置冰上待测。

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 680nm。

② 所有试剂解冻至室温。

③ 在 EP 管中按下表依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一		50
37°C 孵育 5min		
试剂二	250	250
37°C 孵育 10min		
试剂一	50	
37°C 孵育 5min 后，3000rpm 离心 5min，上清液待测。		

④ 显色反应，在 EP 管中：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
上清液	30	30		
标准品			30	
提取液				30
试剂三	150	150	150	150
试剂四	30	30	30	30
37°C 孵育 20min 后（若浑浊则室温 3000rpm 离心 5min），取 200μL 至 96 孔板中，于 680nm 处测定，读取吸光值 A。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。				

【注】1. 若 ΔA 在零附近徘徊，可以延长反应时间 T（如 37°C 孵育 10min 延长至 20min）或增加样本量 V1（如增至 100μL，则试剂二相应减少），则改变后的反应时间 T 和样本量 V1 需代入计算公式重新计算。

2. 若 A 测定值大于 1.5，可以减少样本量 V1（如减至 20μL，用提取液相应补充），则改变后的样本量 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

酶活定义：37°C 每 g 组织每分钟催化血红蛋白水解生成 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位(U)。

$$\text{胃蛋白酶 (U/g 鲜重)} = [\Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times C \text{ 标准} \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 35 \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 37°C每毫克蛋白每分钟催化血红蛋白水解生成 1 μ g 酪氨酸为 1 个酶活单位(U)。

$$\text{胃蛋白酶 (U/mg prot)} = [\Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times C \text{ 标准} \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T$$

$$= 35 \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div Cpr$$

3、液体 LAP 活力的计算:

酶活定义: 37°C每毫升液体每分钟催化血红蛋白水解生成 1 μ g 酪氨酸为 1 个酶活单位(U)。

$$\text{胃蛋白酶 (U/mL)} = [\Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times C \text{ 标准} \times V2] \div V1 \times 2 \div T$$

$$= 70 \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 37°C每 10⁴个细胞每分钟催化血红蛋白水解生成 1 μ g 酪氨酸为 1 个酶活单位(U)。

$$\text{胃蛋白酶 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times C \text{ 标准} \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$= 0.07 \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.05mL;

V2---第③步反应总体积, 0.35mL;

T---反应时间, 10min;

C 标准---50 μ g/mL;

W---样本质量, g;

500---细胞数量, 万

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