

胰蛋白酶测试盒

(货号: BC039 紫外比色法)

一、测定意义:

增高: 大多数急性胰腺炎病人及慢性肾功能衰竭病人的胰蛋白酶明显增高, 半数以上的胰腺癌及慢性胰腺炎病人的胰蛋白酶也增高。但也有 20% 非胰性腹痛病人, 特别是胆囊炎及十二指肠溃疡穿孔病人, 胰蛋白酶也会增高

降低: 慢性胰腺炎, 胆道疾病、慢性胆囊炎等。

二、测定原理:

胰蛋白酶 (trypsin) 能催化水解底物精氨酸乙酯的酯链, 使其在 253nm 处吸光度值升高, 根据吸光度的变化可以计算出酶的活力。

三、试剂盒的组成和配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂	组分	25 管/24 样	50 管/48 样	保存
试剂一	底物粉剂	2 支	3 支	2~8°C
	底物稀释液	30mL×2 瓶	30mL×3 瓶	2~8°C
	底物应用液的配制: 临用前将 1 支粉剂加入到 1 瓶稀释液中, 充分溶解后, 待用。底物应用液必须现用现配, 2~8°C 条件下 24 小时内有效。			
试剂二	匀浆介质	60mL×1 瓶	60mL×2 瓶	2~8°C

四、所需仪器及试剂:

可调 253nm 波长的紫外分光光度计及 0.5cm 光径石英比色皿 (石英比色皿上一般会有“Q”字样), 涡旋混匀器, 电子秤, 37°C 水浴锅, 试管或离心管, 蒸馏水, 秒表, 各种规格移液器。

五、操作过程:

(一)、样本前处理:

血清 (浆) 等液体样本: 直接取样检测;

组织样本: 称取组织, 按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的试剂二 (匀浆介质), 冰浴条件下机械匀浆, 2500~4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清待测。

[注] 匀浆液上清需测定其蛋白含量 (蛋白含量测定试剂盒本公司有售)

(二)、简易操作表: (底物应用液提前 5 分钟 37°C 预温, 分光光度计提前 30 分钟开机预热并调波长 253nm, 石英比色皿蒸馏水调零)

	空白管	测定管
样本 (mL)		a*
试剂二 (mL)	a*	
底物应用液 (mL)	1.5	1.5

样本(或试剂二)与底物应用液混合的同时开始计时, 涡旋混匀, 倒入 0.5cm 光径的石英比色皿中, 于 253nm 处测定吸光度 OD 值, 记下 30 秒时的吸光度 OD 值 A_1 ; 将比色皿置于比色槽中不动, 同时将比色槽温度恒定保持在 37°C; 如果比色槽无法恒温在 37°C, 可将比色皿中的反应液倒入预先编号的原试管中, 放入 37°C 水浴箱中准确水浴 20 分钟, 于 20 分 30 秒时记录吸光度 OD 值 A_2 , 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。(a* 为样本加入量, 一般为



[注]: (1)、在预试过程中, 如果 $\Delta A_{\text{测定}} < 0.050$, 则将样本取样量或样本浓度相应加大后, 再次进行测定。

(2)、在预试过程中, 如果 $\Delta A_{\text{测定}} > 0.250$, 则将样本用样本匀浆介质(试剂二)稀释后, 再次进行测定。

(三)、详细操作过程:

- ①、将紫外分光光度计于 253nm 处, 0.5cm 光径石英比色皿, 用双蒸水调零; (石英比色皿准备两只, 一只用于调零, 一只用于测定)。
- ②、将胰蛋白酶底物应用液 37°C 预温 5 分钟以上;
- ③、往相应编号的试管中加入 a*mL 待测样本, 吸取胰蛋白酶底物应用液 1.5mL 冲入试管中, 快速混匀, 并计时; (空白管取试剂二 a*mL, 吸取工作液 1.5mL 冲入试管中, 快速混匀, 并计时, 其它操作与测定管相同)
- ④、迅速倒入石英比色皿中, 紫外分光光度计, 253nm 处比色, 30 秒时读取吸光度值 A_1 ;
- ⑤、将此比色液倒入原试管中置 37°C 准确水浴 20 分钟, 再迅速倒入石英比色皿中, 20 分 30 秒时读取吸光度值 A_2 ; (读 A_2 数之前最好提前将仪器重新调零)
- ⑥、求出 2 次吸光度差值 ($\Delta A = A_2 - A_1$)。

(四)、酶活力单位定义和计算公式:

①、血清(浆)等液体样本:

单位定义: 在 pH 8.0, 37°C 条件下, 每毫升血清(浆)中含有的胰蛋白酶每分钟使吸光度变化 0.003 即为一个酶活力单位。

计算公式:

$$\text{胰蛋白酶活性 (U/mL)} = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{0.003} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{V_{\text{样}}} \div T$$

②、组织样本:

单位定义: 在 pH 8.0, 37°C 条件下, 每毫克蛋白中含有的胰蛋白酶每分钟使吸光度变化 0.003 即为一个酶活力单位。

计算公式:

$$\text{胰蛋白酶活性 (U/mgprot)} = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{0.003} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \div T \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}})$$

[注]: 一般条件下, 空白管吸光度变化不大;

以上公式中:

$V_{\text{反总}}$ 为反应体系总体积, 1.5+a (mL);

$V_{\text{样}}$ 为样本取样量, a (mL);

T 为反应时间, 20min;

Cpr 为匀浆液蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

③、计算举例:

例 1: 取胰腺炎病人的血浆, 按照操作表血浆取 50 μ L 进行测定: A_1 值是 1.011, A_2 值是 1.088, ($\Delta A_{\text{测定}} = 0.077$); 空白 A_1 值是 0.721, A_2 值是 0.721, ($\Delta A_{\text{空白}} = 0$)。

$$\begin{aligned} \text{胰蛋白酶活性 (U/mL)} &= \frac{0.077 - 0}{0.003} \times \frac{1.55}{0.05} \times \frac{1}{0.05} \div 20 \\ &= 795.667 \text{U/mL} \end{aligned}$$

例 2: 10% 的黏膜匀浆, 按照操作表取 10% 的匀浆 15 μ L 进行测定: A_1 值是 1.009, A_2 值是 1.224 ($\Delta A_{\text{测定}} = 0.215$); 空白 A_1 值是 0.721, A_2 值是 0.721 ($\Delta A_{\text{空白}} = 0$); 同时测得 10% 匀浆的蛋白浓度是 9.0mg/mL。



$$\begin{aligned}\text{胰蛋白酶活性} &= \frac{0.215 - 0}{0.003} \times \frac{1.515}{0.015} \div 20 \div (9.0 \times 0.015) \\ (\text{U/mgprot}) &= 2680.864\text{U/mgprot}\end{aligned}$$

例 3: 取新鲜鲫鱼肠黏膜, 用样本匀浆介质制备成 10% 的黏膜匀浆, 按照操作表取 10% 的匀浆 15 μ L 进行测定: A_1 值是 0.921, A_2 值是 1.051, ($\Delta A_{\text{测定}}=0.130$); 空白 A_1 值是 0.721, A_2 值是 0.721, ($\Delta A_{\text{空白}}=0$); 同时测得 10% 匀浆的蛋白浓度是 8.18mg/mL。

$$\begin{aligned}\text{胰蛋白酶活性} &= \frac{0.130 - 0}{0.003} \times \frac{1.515}{0.015} \div 20 \div (8.18 \times 0.015) \\ (\text{U/mgprot}) &= 1783.483\text{U/mgprot}\end{aligned}$$

例 4: 取新鲜小鼠胰脏, 用样本匀浆介质制备成 10% 的匀浆, 按照操作表取 10% 的匀浆 50 μ L 进行测定: A_1 值是 1.103, A_2 值是 1.166 ($\Delta A_{\text{测定}}=0.063$); 空白 A_1 值是 0.721, A_2 值是 0.721 ($\Delta A_{\text{空白}}=0$); 同时测得 10% 匀浆的蛋白浓度是 7.34mg/mL。

$$\begin{aligned}\text{胰蛋白酶活性} &= \frac{0.063 - 0}{0.003} \times \frac{1.55}{0.05} \div 20 \div (7.34 \times 0.05) \\ (\text{U/mgprot}) &= 88.69\text{U/mgprot}\end{aligned}$$

六、灵敏度: 本试剂盒对于样本中胰蛋白酶的检测下限是 3U/mgprot。



附录 I : 小鼠肠黏膜反应曲线的制备 (仅供参考)

1、样本来源:

取新鲜的小鼠肠黏膜, 用匀浆介质冰水浴条件下制备成 10% 的匀浆, 3500 转/分离心 10 分钟取上清待测。

2、操作表:

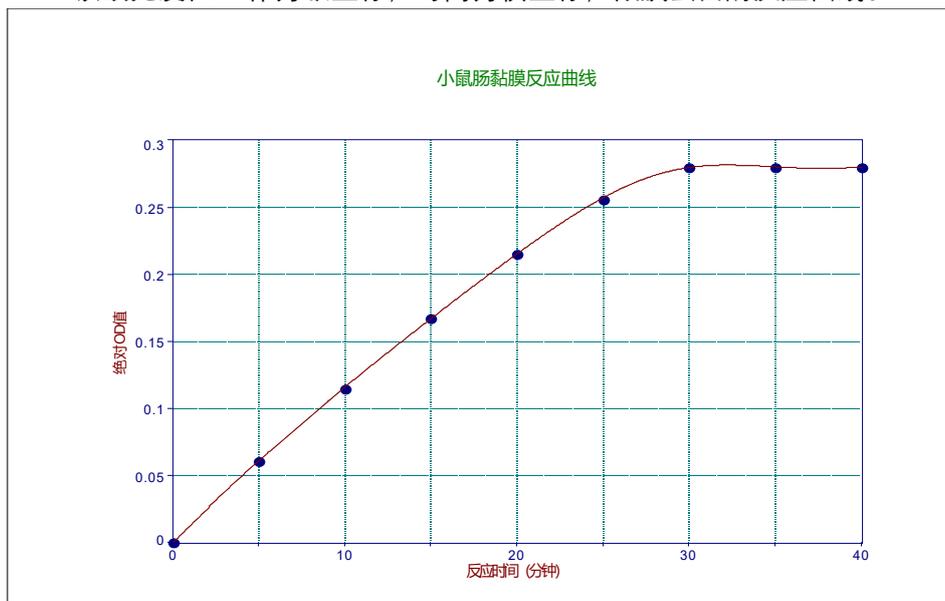
试剂名称	空白管	测定管
胰蛋白酶底物应用液 (mL)	1.5	1.5
37°C 预温 5 分钟		
10% 小鼠肠黏膜匀浆 (mL)		0.015
样本匀浆介质 (mL)	0.015	

样本与底物应用液混合的同时开始计时, 混匀后, 倒入 0.5cm 光径的石英比色皿中, 于 253nm 处测定吸光度 OD 值, 记下 30 秒时的吸光度 OD 值 A_1 ; 将比色皿置于比色槽中不动, 同时将比色槽温度恒定保持在 37°C; 如果比色槽无法恒温在 37°C, 可将比色皿中的反应液倒入预先编号的原试管中, 放入 37°C 水浴箱中, 每隔 5 分钟记录一次吸光度值 A, 直至吸光度稳定不变为止。

3、测定结果:

时间	反应时间 (分钟)	测定 OD 值	绝对 OD 值
30 秒	0	1.009	0
5 分 30 秒	5	1.070	0.061
10 分 30 秒	10	1.124	0.115
15 分 30 秒	15	1.176	0.167
20 分 30 秒	20	1.224	0.215
25 分 30 秒	25	1.265	0.256
30 分 30 秒	30	1.289	0.280
35 分 30 秒	35	1.289	0.280
40 分 30 秒	40	1.289	0.280

以吸光度值 A 作为纵坐标, 时间为横坐标, 做胰蛋白酶反应曲线。



(样本曲线是作样本测定前摸索最佳浓度用的, 也可根据操作表后的注意点判断样本浓度是否合适)





ELK Biotechnology

Tel: +86-027-59760950 Website: www.elkbiotech.cn

地址：武汉市东湖新技术开发区高科园二路盛齐安生物产业园 4 号楼

