

胃蛋白酶活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号：AC10424

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	4℃保存
试剂二	液体 30 mL×1 瓶	4℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前加入 25 mL 试剂二，充分溶解；
- 2、试剂三：临用前加入 25 mL 蒸馏水，充分溶解。

产品说明：

胃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，水解产物酪氨酸在 275nm 下有特征吸收峰。通过测定吸光值的变化来计算酶活。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

操作步骤：**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

称取约 0.1g 组织加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆或者 0.1mL 胃液加入 0.9mL 提取液。10000 rpm 4℃离心 10 分钟，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

1、分光光度计预热30min以上，调节波长至275nm，蒸馏水调零。

2、操作表：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	100	-
试剂一	500	500
混匀，37℃保温 10min。		
试剂三	500	500

摇匀 1min。		
样本	-	100
混匀后 10000rpm 4°C 离心 10min, 取上清用 1mL 石英比色皿, 测定 A275nm, 记为 A 测定和 A 对照, 计算 $\Delta A = A \text{ 测定} - A \text{ 对照}$ 。		

注意：对照管后加样本，而测定管先加样本

三、胃蛋白酶活性计算

1、按样本蛋白浓度计算

活性单位定义：37°C下每毫克蛋白每分钟催化血红蛋白水解生成 1 μ mol 酪氨酸为一个酶活单位。

$$\text{胃蛋白酶酶活 (U/mg prot)} = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总}) \div (C_{pr} \times V \text{ 样本}) \div T = 0.786 \times \Delta A \div C_{pr}$$

2、按样本质量计算

活性单位定义：37°C下每克组织每分钟催化血红蛋白水解生成 1 μ mol 酪氨酸为一个酶活单位。

$$\text{胃蛋白酶酶活 (U/g 质量)} = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总}) \div (W \times V \text{ 样本} \div V \text{ 提}) \div T = 0.786 \times \Delta A \div W$$

3、按液体体积计算

活性单位定义：37°C下每毫升液体每分钟催化血红蛋白水解生成 1 μ mol 酪氨酸为一个酶活单位。

$$\text{胃蛋白酶酶活 (U/mL)} = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总}) \div (V \text{ 样本} \div V \text{ 提} \times V \text{ 液}) \div T = 7.86 \times \Delta A$$

C_{pr} : 样本蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; W : 样本质量, g; $V \text{ 反总}$: 反应总体积, 1.1mL; $V \text{ 提}$: 提取液体积, 1mL; T : 催化反应时间, 10min; $V \text{ 样本}$: 加入样本体积, 0.1mL; ϵ : 酪氨酸吸光系数, 1.4mL/ μ mol/cm; d : 光程, 1cm; $V \text{ 液}$: 液体体积, 0.1mL。

实验实例:

1、取 0.1g 小鼠胃加入 1mL 提取液充分研磨, 10000rpm 4°C离心 10 分钟, 取上清稀释 2 倍, 置冰上, 按照测定步骤操作, 测得计算 $\Delta A = A \text{ 测定} - A \text{ 对照} = 1.234 - 1.199 = 0.035$, 按样本质量计算酶活得:

$$\text{胃蛋白酶酶活 (U/g 质量)} = 0.786 \times \Delta A \div W \times 2 \text{ (稀释倍数)} = 0.5502 \text{ U/g 质量。}$$