

胰蛋白酶（Trypsin）试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

胰蛋白酶选择性水解变性蛋白质中由赖氨酸或精氨酸的羧基所构成的肽链，是一种重要的消化酶。此外，胰蛋白酶还广泛应用于脓胸、血胸、外科炎症、溃疡、创伤性损伤等所产生的局部水肿、血肿及脓肿等的辅助治疗。

测定原理：

胰蛋白酶催化水解TAME的酯键，释放出的游离羧基与反应体系中的氢氧化钠发生中和反应，导致溶液的pH值降低，以苯酚红为指示剂，测定溶液在555nm处吸收值的变化，可以快速测得胰蛋白酶活性数据。胰蛋白酶在一定范围内与555nm处吸收值的降低呈良好的线性关系。

自备仪器和用品：

酶标仪、96孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体120 mL×1瓶，4°C保存。

试剂一：液体5 mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：液体5 mL×1瓶，4°C避光保存。

试剂三：液体2 mL×1瓶，4°C保存。

粗酶液提取：

1. 组织样品：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液）冰浴匀浆，10000g，4°C离心10min，取上清，即粗酶液。

测定步骤：

1. 酶标仪预热30 min，调节波长到555 nm。
2. 工作液的配制：临用前根据用量按照试剂一（V）：试剂二（V）：蒸馏水（V）：试剂三（V）=1 mL：1 mL：5.4 mL：0.4 mL的比例充分混合。（注意：现用现配，用多少配多少，在空瓶中配制，试剂盒中带有4个空瓶）
3. 吸取5 μ L样本，加入195 μ L工作液，混匀后立即测定，记录555nm下1min时的吸光值A1和2min时的吸光值A2。计算 $\Delta A=A1-A2$

注意：如果 ΔA 小于0.005，可将反应时间延长到5min。如果 ΔA 大于0.5，体系迅速变色，可将样本用提取液稀释后测定（建议稀释10倍），计算公式中乘以相应稀释倍数。

胰蛋白酶活性计算公式：

使用96孔板测定的计算公式如下

（1）按蛋白浓度计算

活性单位定义：室温下每毫克蛋白质每分钟催化555nm处吸光值减少0.5为1个酶活单位。

$$\text{胰蛋白酶 (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr} \times V_1) \div 0.5 \div T$$

$$= 80 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：室温每克组织每分钟催化555nm处吸光值减少0.5为1个酶活单位。

$$\text{胰蛋白酶 (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_1 \div V_2) \div 0.5 \div T = 80 \times \Delta A \div W$$

Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL)，需要另外测定；W: 组织质量 (g)；V1: 加入反应体系中粗酶液体积 (mL)，5 μL =0.005 mL；V2: 粗酶液总体积 (mL)，1 mL；V反总: 反应总体积，0.2 mL；T: 反应时间 (min)，1 min。