

胃蛋白酶（Pepsin）试剂盒说明书

分光光度法 50管/24样

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：

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、慢性十二指肠炎等症状时也会引起胃蛋白酶分泌的减少。

测定原理：

胃蛋白酶可催化血红蛋白水解，水解产物与福林试剂反应后显蓝色；一定范围内，其颜色的深浅与胃蛋白酶活性呈正比。

自备仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加入 25 mL 试剂二充分溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 25 mL 蒸馏水充分溶解。

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 30 mL 蒸馏水充分溶解。

试剂六：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存。

标准品：液体 1.26mL×1 支，0.5 μmol/mL 酪氨酸标准溶液浓度 4℃ 保存。

粗酶液提取：

组织样品：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）冰浴匀浆，8000g，4℃ 离心 10min，取上清，即粗酶液。

测定步骤：

1. 分光光度计预热 30min，调节波长到 580 nm，蒸馏水调零。

2. 试剂三和试剂四置于 37℃ 水浴预热 30min。

3. 标准管：取玻璃比色皿，加入 100μL 标准品，200μL 试剂二，600μL 试剂五，100μL 试剂六，混匀后室温静置 20min，于 580 nm 测光吸收，记为 A 标准管。

4. 空白管：取玻璃比色皿，加入 100μL 蒸馏水，200μL 试剂二，600μL 试剂五，100μL 试剂六，混匀后室温静置 20min，于 580 nm 测光吸收，记为 A 空白管。

5. 对照管：取 EP 管，加入 500 μL 蒸馏水，置于 37℃ 水浴保温 10min；加入 500μL 试剂四，盖紧后摇匀 1min；加入 100μL 粗酶液，混匀后 8000g 4℃ 离心 10 分钟取上清；在玻璃比色皿中加入上清液 100μL，再加入 200μL 试剂二，600μL 试剂五，100μL 试剂六，混匀后室温静置 20min，于 580 nm 测光吸收，记为 A 对照管。

6. 测定管：取 EP 管，加入 100μL 粗酶液，500 μL 试剂三，置于 37℃ 水浴保温 10min；加入 500μL 试剂四，

盖紧后摇匀 1min；8000g 4℃离心 10 分钟取上清；在玻璃比色皿中加入上清液 100 μ L，再加入 200 μ L 试剂二，600 μ L 试剂五，100 μ L 试剂六，混匀后室温静置 20min，于 580 nm 测光吸收，记为 A 测定管。

注意：空白管和标准管只需要测定一次。

计算公式：

(1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义：37℃每毫克蛋白每分钟催化血红蛋白水解生成 1nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

胃蛋白酶活性 (nmol/min/mg prot) = C 标准品 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \times 稀释倍数 \div (Cpr \times V1) \div T = 5500 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \div Cpr

C 标准品：标准品浓度，0.5 μ mol/mL 酪氨酸；稀释倍数：(100+500+500) \div 100=11；Cpr：粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL)，需要另外测定；V1：加入反应体系中粗酶液体积 (mL)，100 μ L=0.1 mL；T：催化反应时间 (min)，10min。

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：37℃每克组织每分钟催化血红蛋白水解生成 1nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

胃蛋白酶活性 (nmol/min/g 鲜重) = C 标准品 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \times 稀释倍数 \div (W \times V1 \div V2) \div T = 5500 \times (A 测定管 - A 对照管) \div (A 标准管 - A 空白管) \div W

C 标准品：标准品浓度，0.5 μ mol/mL 酪氨酸；稀释倍数：(100+500+500) \div 100=11；W：组织质量 (g)；V1：加入反应体系中粗酶液体积 (mL)，100 μ L=0.1 mL；V2：粗酶液总体积 (mL)，1mL；T：催化反应时间 (min)，10min。

注意事项

试剂三、试剂四、试剂五临用前配制，配制好用不完的试剂 4℃可保存一周。