

胃蛋白酶(Pepsin)活性试剂盒(UV 法)

编号: ml300885

微量法 100 管/48 样

注 意: 正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

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, 水解产物在 280nm 有特征吸收峰。通过计算吸光值的变化来计算酶活。

自备仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔 UV 板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

试剂清单:

试剂名称	规格	数目	贮藏	
试剂一	液体 100mL	x1	4°C	
试剂二	液体 20mL	x1	4°C	
试剂三	粉剂	x1	4°C,避光	临用前加入 10mL 试剂二充分溶解
试剂四	粉剂	x1	4°C	临用前加入 10mL 蒸馏水充分溶解

样品提取（按照步骤依次操作）：

一、组织样品

- 1、称取约 0.1g 组织加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆或者 0.1mL 胃液加入 0.9mL 试剂一冰浴匀浆，然后离心 10min（8000g 离心力 4℃），取上清，记作粗酶液。

实验准备：

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 280nm，蒸馏水调零；
- 2、试剂三、试剂四置于 37℃水浴预热 30min。

测定操作：

- 1、在 EP 管中依次操作

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
粗酶液	30	-
蒸馏水	-	150
标准品	-	-
试剂三	150	-
37℃水浴保温 10min		
试剂四	150	150
盖紧后摇匀 1min		
粗酶液	-	30
混匀后离心 10min（8000g 离心力 4℃）		
取 200uL 上清于 UV 板中 280nm 测定吸光值 A。ΔA=A 测定-A 对照		

注意事项：

试剂三、试剂四临用前配制，配制好用不完的试剂 4℃可保存一周。

2.建议吸光值在 0.1-1.0 之间，若大于 1.0 则需要稀释，小于 0.1 则增加浓度。

结果计算：

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：37°C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 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{胃蛋白酶活性(U/mg prot)} &= (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}}) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \div T \\ &= 1.57 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\begin{aligned} \text{胃蛋白酶酶活 (U/g 质量)} &= (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}}) \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提}}) \div T \\ &= 1.57 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{胃蛋白酶酶活 (U/mL)} &= (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}}) \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提}} \times V_{\text{液}}) \div T \\ &= 15.71 \times \Delta A \end{aligned}$$

W: 组织质量(g);

ε : 酪氨酸吸光系数, 1.4 $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{cm}^{-1}$;

V 反总: 反应总体积, 0.33mL;

d: 光程, 0.5cm

T: 催化反应时间(min), 10min。

V 液: 液体体积, 0.1mL

V 提: 粗酶液总体积, 1mL;

Cpr: 粗酶液蛋白质浓度(mg/mL), 需要另外测定;

V 样本: 加入样本体积, 0.03mL;

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。