

胃蛋白酶 (Pepsin) 试剂盒说明书

(货号: G1210W 微板法 48 样)

一、产品简介:

胃蛋白酶 (Pepsin) 是一种消化性蛋白酶, 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、慢性十二指肠炎等状况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生成含酚的氨基酸, 含酚的氨基酸与福林酚反应后显蓝色; 其颜色的深浅与胃蛋白酶活性呈正比。

二、试剂盒组分与配制:

| 试剂名称 | 规格 | 保存条件 | 备注 |
|------|-------------|-------|---|
| 提取液 | 液体 50mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 液体 5mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂二 | 粉体 mg×2 瓶 | 4°C保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部, 每瓶再加 13mL 蒸馏水溶解备用。 |
| 试剂三 | 液体 15mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂四 | 液体 3mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 标准品 | 粉体 mg×1 支 | 4°C保存 | 临用前加 2mL 提取液, 再用蒸馏水稀释 10 倍, 即为 0.05mg/mL 酪氨酸。 |

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、天平、研钵、冰和蒸馏水。

四、胃蛋白酶活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×3500rpm 离心 5min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 液体样本: 液体用提取液按照 1:1 的比例混合稀释后, 4°C×3500rpm, 离心 5min, 取上清液检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 680nm。

② 所有试剂解冻至室温。

③ 在 EP 管中依次加入:

| | | |
|---|-----|-----|
| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
| 样本 | 50 | 50 |
| 试剂一 | | 50 |
| 37°C 孵育 5min | | |
| 试剂二 | 250 | 250 |
| 37°C 孵育 10min | | |
| 试剂一 | 50 | |
| 37°C 孵育 5min 后, 3000rpm 离心 5min, 上清液待测。 | | |

④ 显色反应, 在 EP 管中:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 | 标准管 (仅做一次) | 空白管 (仅做一次) |
|--|-----|-----|---------------|---------------|
| 上清液 | 30 | 30 | | |
| 标准品 | | | 30 | |
| 提取液 | | | | 30 |
| 试剂三 | 150 | 150 | 150 | 150 |
| 试剂四 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| 37°C 孵育 20min 后 (若浑浊则室温 3000rpm 离心 5min), 取 200μL 至 96 孔板中, 于 680nm 处测定, 读取吸光值 A。ΔA=A 测定-A 对照 (每个样本做一个自身对照)。 | | | | |

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调; 针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 37°C 每毫克蛋白每分钟催化血红蛋白水解生成 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{胃蛋白酶(U/mg prot)} &= [\Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times C_{\text{标准}} \times V_2] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 35 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 37°C 每 g 组织每分钟催化血红蛋白水解生成 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{胃蛋白酶(U/g 鲜重)} &= [\Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times C_{\text{标准}} \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 35 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \end{aligned}$$

3、按液体体积计算:

酶活定义: 37°C 每毫升液体每分钟催化血红蛋白水解生成 1μg 酪氨酸为 1 个酶活单位(U)。

$$\text{胃蛋白酶(U/mL)} = [\Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times C_{\text{标准}} \times V_2] \div V_1 \times 2 \div T = 70 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.05mL;

V2---第③步反应总体积, 0.35mL;

T---反应时间, 10min;

C 标准---50μg/mL;

W---样本质量, g;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。