

胰蛋白酶 (Trypsin) 试剂盒说明书

(货号: BP10014F 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

胰蛋白酶(EC 3.4.4.4) 是蛋白酶的一种, 可以催化水解酰胺键。是一种重要的消化酶。

胰蛋白酶催化水解 N-苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基苯胺盐酸盐(BAPNA)生成对硝基苯胺, 后者在 405nm 有最大吸收峰, 通过测定吸光值升高速率即可得出胰蛋白酶的活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 50mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 1.2mL×1 支	-20°C保存	1. 若凝固则可于 37°C水浴至融化; 2. 保质期与试剂盒效期相同。
标准品	粉体 1 支	4°C避光保存	1. 若重做标曲, 则用到该试剂; 2. 保质期与试剂盒效期相同。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 生理盐水, 进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min, 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: 若是澄清液体, 直接检测, 若液体样本浑浊, 需 4°C×12000rpm, 离心 10min, 取上清液检测。

③ 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 生理盐水, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

① 打开分光光度计, 设置温度 37°C (若仪器无法控温, 则等待仪器过自检程序即可), 调节波长到 405 nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至 37°C或 37°C水浴 15-30min。

③ 反应 mix 制备: 试剂二若凝固则可于 37°C水浴至融化, 再按照试剂一: 试剂二=0.97mL: 0.03mL 混匀成反应 mix, 现配现用, 用多少量配制多少反应 mix。

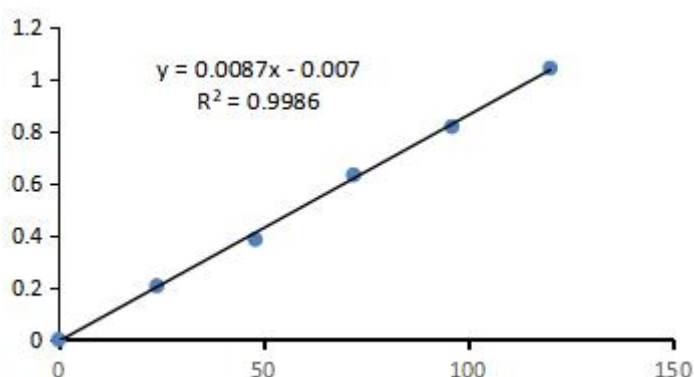
④ 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	120
反应 mix	680
混匀, 立即于 405nm 处测定吸光值 A1, 37°C 条件下反应 10min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：若 ΔA 在零附近徘徊, 可以延长反应时间 T (如延长至 20min 后读取 A2) 或增加样本量 V1 (如增至 150μL, 则反应 mix 相应减少), 则改变后的 T 和样本量 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.0087x - 0.007$: x 为标准品(nmoL), y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

胰蛋白酶(nmol/min/g 鲜重) = $[(\Delta A + 0.007) \div 0.0087] \div (W \times V1 \div V) \div T = 95.79 \times (\Delta A + 0.007) \div W$

3、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

胰蛋白酶(nmol/min/mg prot) = $[(\Delta A + 0.007) \div 0.0087] \div (V1 \times Cpr) \div T = 95.79 \times (\Delta A + 0.007) \div Cpr$

4、按照液体体积计算:

单位定义: 每毫升液体每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺定义为一个酶活单位 (U)。

胰蛋白酶(nmol/min/mL) = $[(\Delta A + 0.007) \div 0.0087] \div V1 \div T = 95.79 \times (\Delta A + 0.007)$

5、按细胞数量计算:

单位定义: 每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1nmol 对硝基苯胺为一个酶活单位 (U)。

胰蛋白酶(nmol/min/ 10^4 cell) = $[(\Delta A + 0.007) \div 0.0087] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.191 \times (\Delta A + 0.007)$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.12 mL;

W---样本质量, g;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

T---反应时间, 10min;

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;

附: 标准曲线制作过程:

1 标曲为非必做实验, 用户可根据实验需求制作标曲, 亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。

2 制备标准品母液 (50μmol/mL): 临用前 8000g 4°C 离心 2min 使试剂落入管底, 加入 0.5mL 乙醇,

涡旋震荡溶解后再加入 0.5mL 的蒸馏水混匀，得到 50 μ mol/mL 备用

- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 100uL，加入 4.9mL 蒸馏水，混匀得到 1 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。
在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（ μ L）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	120	
蒸馏水		120
试剂一	680	680
混匀，于 405nm 处测定吸光值 A		