

胰蛋白酶 (Trypsin) 检测试剂盒微板法

使用说明书

产品货号: BP10014W

注意: 请在试剂盒保质期内使用, 具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用, 不能用于临床诊断。

检测范围: 1-100U/L

灵敏度: 1U/L

有效期: 6个月

保存温度: 2-8℃和-20℃

检测原理:

胰蛋白酶(Trypsin)催化底物生成对硝基苯胺(p-NA), 该物质在 405nm 波长下有最大吸收峰。由于 p-NA 的吸光度与含量成正比, 通过测定吸光值升高速率即可得出胰蛋白酶的活性大小。本试剂盒检测组织样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用 BCA 法。

注意事项:

1. 不能使用过期产品, 不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用, 以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病, 所有的样品都应管理好, 按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂, 使用前请甩几下, 使粉剂落入底部。

试剂盒组分：

| 试剂名称 | 规格（48T/40S） | 规格（96T/88S） | 保存条件 |
|------|-------------|-------------|---------|
| 试剂一 | 60mL×1 瓶 | 120mL×1 瓶 | 2-8℃ |
| 试剂二 | 粉剂×1 瓶 | 粉剂×2 瓶 | -20℃，避光 |
| 试剂三 | 2mL×1 瓶 | 4mL×1 瓶 | 2-8℃，避光 |
| 标准品 | 粉剂×1 瓶 | 粉剂×2 瓶 | 2-8℃，避光 |

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、恒温箱。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**, 建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 1-100U/L, 如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩, 样本的稀释液为试剂一。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议做预实验验证其检测有效性。
3. **组织样本**: 按照样本质量(g): 体积(mL)为 1: 10 的比例加入匀浆介质(建议取 0.1g 组织样本, 加入 1mL 试剂一)进行机械匀浆。4° C, 10000 g 离心 10min, 取上清待测, 如果需要检测蛋白浓度, 可留取部分上清进行蛋白浓度测定。
4. **血清(浆)等液体样本**: 直接测定。若浑浊, 离心后取上清测定。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. **试剂二工作液配制:** 临用前取 1 支试剂二加入 0.4mL 试剂三，溶解混匀，4 小时内使用完。
3. **反应工作液配制:** 将试剂一和试剂二工作液按体积比=24:1 配制，现配现用。

标准品配制: 取 1 支标准品加入 1mL 试剂三，溶解混匀，未使用完的试剂可在-20° C 避光保存 7 天。取溶解好的标准品和试剂一按照 1:19 的比例配置成 1mmol/L 标准品，现配现用，按需配制，4 小时内使用完。稀释成以下浓度的标准品工作液：0mmol/L、0.2mmol/L、0.3mmol/L、0.4mmol/L、0.6mmol/L、0.7mmol/L、0.8mmol/L、1mmol/L。（注：配制目标浓度的标准品工作液时，每次请根据表格从标准品母液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。）

| 编号 | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ | ⑦ | ⑧ |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标准品浓度 (mmol/L) | 0 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 1 |
| 1mmol/L 标准品(μL) | 0 | 40 | 60 | 80 | 120 | 140 | 160 | 200 |
| 试剂一(μL) | 200 | 160 | 140 | 120 | 80 | 60 | 40 | 0 |

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准孔加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用试剂一稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

操作步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。
2. 样本测定 (在 96 孔板中依次加入):

| 试剂名称(μ L) | 标准孔 | 测定孔 |
|----------------|-----|-----|
| 样本 | | 30 |
| 不同浓度的标准品 | 30 | |
| 反应工作液 | 170 | 170 |

混匀, 在 405nm 波长处检测测定孔 OD 值 A_1 。37°C 孵育 10min 后, 在 405nm 波长处检测标准孔吸光度和测定孔 OD 值 A_2 。

注意:

如果 $A_2 - A_1$ 接近于零, 可延长反应时间, 如延长至 20min 读取 A_2 , 则计算公式的反应时间为 20min。

实验结果结算：

1. 标准品拟合曲线： $y=ax+b$ 。

2. 按样本鲜重计算：

单位定义：每千克组织每分钟催化产生 $1 \mu\text{mol}$ 对硝基苯胺为一个酶活单位(U)。

$$\text{胰蛋白酶}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg 鲜重})=(\Delta A-b) \div a \div T \times N \div (W \div V) \times 1000$$

3. 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每克组织蛋白每分钟催化产生 $1 \mu\text{mol}$ 对硝基苯胺为一个酶活单位(U)。

$$\text{胰蛋白酶}(\text{U}/\text{gprot})=(\Delta A-b) \div a \div T \times N \div \text{Cpr} \times 1000$$

4. 按照液体体积计算：

单位定义：每升液体每分钟催化产生 $1 \mu\text{mol}$ 对硝基苯胺定义为一个酶活单位(U)。

$$\text{胰蛋白酶}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L})=(\Delta A-b) \div a \div T \times N \times 1000$$

注：

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值
(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

a: 标准曲线斜率

x: 标准品的浓度

b: 标准曲线截距

T: 反应时间, 10min

1000: $1\text{mmol}/\text{L}=1000 \mu\text{mol}/\text{L}$

ΔA : 样本的绝对 OD 值

($\Delta A=A_2 - A_1$)

Cpr: 待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

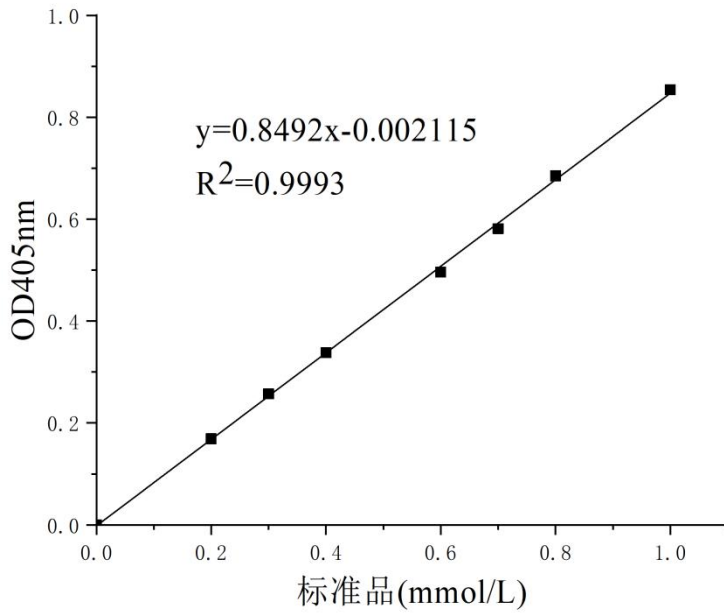
W: 样本鲜重, g

V: 匀浆加入试剂一的体积, mL

N: 样本的稀释倍数

参考曲线:

$y=0.8492x-0.002115, R^2=0.9993$, x 是标准品的浓度 (mmol/L), y 是 ΔA 。



注意：本图仅供参考，应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。