

## 胰蛋白酶 (Trypsin) 试剂盒说明书 (微板法 96 样)

### 一、产品简介:

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:

| 试剂名称 | 规格           | 保存条件    | 备注                |
|------|--------------|---------|-------------------|
| 试剂一  | 液体 30mL×1 瓶  | 4°C保存   |                   |
| 试剂二  | 液体 0.6mL×1 支 | -20°C保存 | 若凝固则可于 37°C水浴至融化。 |
| 标准品  | 粉体 mg×1 支    | 4°C保存   | 若重做标曲, 则用到该试剂。    |

### 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、胰蛋白酶活性测定:

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 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 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<sup>4</sup>): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

##### ③ 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。

#### 2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。

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**。

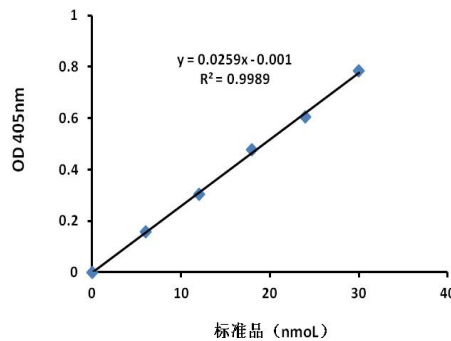
④ 在 96 孔板中依次加入:

| 试剂名称 (μL)  | 测定管 |
|--|-----|
| 样本   | 30  |
| 反应 mix   | 170 |
| 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 $\Delta A$  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 50μL，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： $y = 0.0259x - 0.001$ ；x 为标准品(nmoL)，y 为 $\Delta A$ 。



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)=[ $(\Delta A+0.001) \div 0.0259$ ] $\div (W \times V1 \div V) \div T = 128.7 \times (\Delta A+0.001) \div W$

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)=[ $(\Delta A+0.001) \div 0.0259$ ] $\div (V1 \times Cpr) \div T = 128.7 \times (\Delta A+0.001) \div Cpr$

4、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)=[ $(\Delta A+0.001) \div 0.0259$ ] $\div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.26 \times (\Delta A+0.001)$

5、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)=[ $(\Delta A+0.001) \div 0.0259$ ] $\div V1 \div T = 128.7 \times (\Delta A+0.001)$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.03 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 制备标准品母液（10μmol/mL）：临用前甩几下或离心，使粉体落入底部，加入 0.1mL 乙醇，涡旋震荡溶解后再加入 0.9mL 的蒸馏水混匀，得到 10μmol/mL 备用。
- 2 用蒸馏水把母液稀释成以下浓度：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1μmol/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 3 30μL 标准品+170μL 试剂一，混匀后于 405nm 处读取 A 值，依据结果即可制作标准曲线。