

胃蛋白酶 (Pepsin) 检测试剂盒 (分光光度法)

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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，水解产物与福林试剂反应后显蓝色；一定范围内，其颜色的深浅与胃蛋白酶活性呈正比。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加入 25 mL 试剂二充分溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 25 mL 蒸馏水充分溶解。

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 30 mL 蒸馏水充分溶解。

试剂六：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存。

标准品：液体 1.26mL×1 支，0.5 μ mol/mL 酪氨酸标准溶液浓度 4℃ 保存。

粗酶液提取：

组织样品：按照组织质量 (g)：试剂一体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）冰浴匀浆，8000g，4℃ 离心 10min，取上清，即粗酶液。

测定步骤：

1. 分光光度计预热 30min，调节波长到 580 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂三和试剂四置于 37℃ 水浴预热 30min。
3. **标准管：**取玻璃比色皿，加入 **100μL 标准品**，200μL 试剂二，600μL 试剂五，100μL 试剂六，混匀后室温静置 20min，于 580 nm 测光吸收，记为 A 标准管。
4. **空白管：**取玻璃比色皿，加入 **100μL 蒸馏水**，200μL 试剂二，600μL 试剂五，100μL 试剂六，混匀后室温静置 20min，于 580 nm 测光吸收，记为 A 空白管。
5. **对照管：**取 EP 管，加入 500 μL 蒸馏水，置于 37℃ 水浴保温 10min；加入 500μL 试剂四，盖紧后摇匀 1min；加入 **100μL 粗酶液**，混匀后 8000g 4℃ 离心 10 分钟取上清；在玻璃比色皿中加入上清液 100μL，

再加入 200 μ L 试剂二，600 μ L 试剂五，100 μ L 试剂六，混匀后室温静置 20min，于 580 nm 测光吸收，记为 A 对照管。

6. **测定管**：取 EP 管，加入 **100 μ L 粗酶液**，500 μ L 试剂三，置于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 10min；加入 500 μ L 试剂四，盖紧后摇匀 1min；8000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟取上清；在玻璃比色皿中加入上清液 100 μ L，再加入 200 μ L 试剂二，600 μ L 试剂五，100 μ L 试剂六，混匀后室温静置 20min，于 580 nm 测光吸收，记为 A 测定管。

注意：空白管和标准管只需测定一次。

计算公式：

(1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C 每毫克蛋白每分钟催化血红蛋白水解生成 1nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{胃蛋白酶活性 (nmol/min/mg prot)} &= C \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times \\ &\quad \text{稀释倍数} \div (Cpr \times V1) \div T \\ &= 5500 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr \end{aligned}$$

C 标准品：标准品浓度，0.5 μ mol/mL 酪氨酸；

稀释倍数：(100+500+500) \div 100=11；

Cpr：粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL)，需要另外测定；

V1：加入反应体系中粗酶液体积 (mL)，100 μ L=0.1 mL；

T：催化反应时间 (min)，10min。

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C 每克组织每分钟催化血红蛋白水解生成 1nmol 酪氨酸为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{胃蛋白酶活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= C \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times \\ &\quad \text{稀释倍数} \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 5500 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

C 标准品：标准品浓度，0.5 μ mol/mL 酪氨酸；

稀释倍数：(100+500+500) \div 100=11；

W：组织质量 (g)；

V1：加入反应体系中粗酶液体积 (mL)，100 μ L=0.1 mL；

V2：粗酶液总体积 (mL)，1mL；

T：催化反应时间 (min)，10min。

注意事项：

试剂三、试剂四、试剂五临用前配制，配制好用不完的试剂 4 $^{\circ}$ C 可保存一周。