

胰蛋白酶（Trypsin）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：

胰蛋白酶选择性水解变性蛋白质中由赖氨酸或精氨酸的羧基所构成的肽链，是一种重要的消化酶。此外，胰蛋白酶还广泛应用于脓胸、血胸、外科炎症、溃疡、创伤性损伤等所产生的局部水肿、血肿及脓肿等的辅助治疗。

测定原理：

胰蛋白酶催化水解 TAME 的酯键，释放出的游离羧基与反应体系中的氢氧化钠发生中和反应，导致溶液的 pH 值降低，以苯酚红为指示剂，测定溶液在 555nm 处吸收值的变化，可以快速测得胰蛋白酶活性数据。胰蛋白酶在一定范围内与 555nm 处吸收值的降低呈良好的线性关系。

试剂组成和配制：

提取液：液体 60 mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 10 mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 10mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂三：液体 4 mL×1 瓶，4℃ 保存。

粗酶液提取：

组织样品：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）冰浴匀浆，10000g，4℃ 离心 10min，取上清，即粗酶液。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 555 nm, 蒸馏水调零。
2. 工作液的配制: 临用前根据用量按照试剂一 (V) : 试剂二 (V) : 蒸馏水 (V) : 试剂三 (V) = 1 mL : 1 mL : 5.4 mL : 0.4 mL 的比例充分混合。(注意: 现用现配, 用多少配多少, 在空瓶中配制, 试剂盒中带有 4 个空瓶)
3. 吸取 25 μL 样本, 加入 975 μL 工作液, 混匀后立即测定, 记录 555 nm 下 1 min 时的吸光值 A1 和 2 min 时的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A1 - A2$

注意: 如果 ΔA 小于 0.005, 可将反应时间延长到 5 min。如果 ΔA 大于 0.5, 体系迅速变色, 可将样本用提取液稀释后测定 (建议稀释 10 倍), 计算公式中乘以相应稀释倍数。

胰蛋白酶活性计算公式:

使用石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义: 室温下每毫克蛋白质每分钟催化 555 nm 处吸光值减少 1 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{胰蛋白酶 (U/mg prot)} &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 40 \times \Delta A \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义: 室温每克组织每分钟催化 555 nm 处吸光值减少 1 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{胰蛋白酶 (U/g 鲜重)} &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 40 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定;

W: 组织质量 (g);

V1: 加入反应体系中粗酶液体积 (mL), 25 μL = 0.025 mL;

V2: 粗酶液总体积 (mL), 1 mL;

V 反总: 反应总体积, 1 mL;

T: 反应时间 (min), 1 min。