

胃蛋白酶（Pepsin）检测试剂盒（微量法）

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 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加入 10mL 试剂二充分溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 10mL 蒸馏水充分溶解。

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 15mL 蒸馏水充分溶解。

试剂六：液体 3.3mL×1 瓶，4℃ 保存。

标准品：液体 1.27mL×1 支，0.5μmol/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/酶标仪预热 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：**取微量玻璃比色皿/96 孔板，加入 20μL 标准品，40μL 试剂二，120μL 试剂五，20μL 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：**取微量玻璃比色皿/96 孔板，加入 20μL 蒸馏水，40μL 试剂二，120μL 试剂五，20μL 试剂六，混匀后室温静置 20min，于 580 nm 测光吸收，记为 A 标准空白管。
5. **对照管：**取 EP 管，加入 100 μL 蒸馏水，置于 37℃ 水浴保温 10min；加入 100μL 试剂四，盖紧后摇匀 1min；加入 20μL 粗酶液，混匀后 8000g 4℃ 离心 10 分钟取上清；在微量玻璃比色皿/96 孔板加入上清液 20μL，再加入 40μL 试剂二，120μL 试剂五，20μL 试剂六，混匀后室温静置 20min，于 580 nm 测光吸收，记为 A 空白管。

6. **测定管**：取 EP 管，加入 20 μ L 粗酶液，100 μ L 试剂三，置于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 10min；加入 100 μ L 试剂四，盖紧后摇匀 1min；8000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟取上清；在微量玻璃比色皿/96 孔板加入上清液 20 μ L，再加入 40 μ L 试剂二，120 μ L 试剂五，20 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要测定一次。

计算公式：

(1) 按蛋白浓度计算

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。

$$\begin{aligned} \text{胃蛋白酶活性 (nmol/min/mg prot)} &= C \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V1 \\ &\quad \times \text{稀释倍数} \div (Cpr \times V1) \div T \\ &= 550 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

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。

$$\begin{aligned} \text{胃蛋白酶活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= C \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V1 \\ &\quad \times \text{稀释倍数} \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 550 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

C 标准品：标准品浓度，0.5 μ mol/mL 酪氨酸；

稀释倍数：(20+100+100) \div 20=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)，20 μ L=2 \times 10⁻²mL；

W：组织质量 (g)；

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。