

## 胃蛋白酶(Pepsin)活性检测试剂盒 (UV法)

规格：微量法 100管/48样

编号：JLC\_K14857

### 注意

1、正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定；

### 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，水解产物在280nm有特征吸收峰。通过计算吸光值的变化来计算酶活。

### 需自备的仪器和用品

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔UV板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 试剂组成和配制

试剂名称	规格	数目	贮藏	
试剂一	液体100mL	x1	4℃	
试剂二	液体20mL	x1	4℃	
试剂三	粉剂	X1	4℃,避光	临用前加入10mL试剂二充分溶解
试剂四	液体	x1	4℃	临用前加入10mL蒸馏水充分溶解

### 样品提取(按照步骤依次操作)

一、组织样品

1、称取约0.1g组织加入1mL试剂一进行冰浴匀浆或者0.1mL胃液加入0.9mL试剂一冰浴匀浆，然后离心10min（8000g离心力 4℃），取上清，记作粗酶液。

### 实验准备

- 1、分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长到280nm，蒸馏水调零；
- 2、试剂三、试剂四置于37℃水浴预热30min。

### 测定操作表

- 1、在EP管中依次操作

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
粗酶液	30	-
蒸馏水	-	150
标准品	-	-
试剂三	150	-
37℃水浴保温10min		
试剂四	150	150
盖紧后摇匀1min		
粗酶液	-	30
混匀后离心10min（8000g离心力 4℃）取200uL上清于UV板中280nm测定吸光值A。ΔA=A测定-A对照		

### 注意事项：

试剂三、试剂四临用前配制，配制好用不完的试剂 4℃可保存一周。

2.建议吸光值在0.1-1.0之间，若大于1.0则需要稀释，小于0.1则增加浓度。

### 结果计算

#### (1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：37℃每毫克蛋白每分钟催化血红蛋白水解生成1μmol酪氨酸为1个酶活单位。

胃蛋白酶活性(U/mg prot)=(ΔA÷ε÷d×V反总) ÷ (Cpr×V样本) ÷T=1.57×ΔA÷Cpr

#### (2) 按样本质量计算

活性单位定义：37℃每克组织每分钟催化血红蛋白水解生成1μmol酪氨酸为1个酶活单位。

胃蛋白酶酶活 (U/g 质量) = (ΔA÷ε÷d×V反总) ÷ (W×V样本÷V提) ÷T

=1.57×ΔA÷W

### (3) 按液体体积计算

活性单位定义：37°C下每毫升液体每分钟催化血红蛋白水解生成1μmol酪氨酸为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{胃蛋白酶酶活 (U/mL)} &= (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}}) \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提}} \times V_{\text{液}}) \div T \\ &= 15.71 \times \Delta A \end{aligned}$$

W: 组织质量(g);

V反总: 反应总体积, 0.33mL;

T: 催化反应时间(min), 10min。

ε: 酪氨酸吸光系数, 1.4 μmol<sup>-1</sup>·mL·cm<sup>-1</sup>;

d: 光程, 0.5cm

V液: 液体体积, 0.1mL

V提: 粗酶液总体积, 1mL;

Cpr: 粗酶液蛋白质浓度(mg/mL), 需要另外测定;

V样本: 加入样本体积, 0.03mL;

### **预实验的意义**

#### **比色法检测试剂盒预实验非常重要**

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过3 - 5组预实验，判断试剂盒对于样本的适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。