

## 胃蛋白酶（Pepsin）试剂盒说明书

微量法 100T/48S

**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。

### 自备仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、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°C 水浴预热 30min。
3. **标准管:** 取微量玻璃比色皿/96 孔板, 加入 20 $\mu$ L 标准品, 40 $\mu$ L 试剂二, 120 $\mu$ L 试剂五, 20 $\mu$ L 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 20 $\mu$ L 蒸馏水, 40 $\mu$ L 试剂二, 120 $\mu$ L 试剂五, 20 $\mu$ L 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  $\mu$ L 蒸馏水, 置于 37°C 水浴保温 10min; 加入 100  $\mu$ L 试剂四, 盖紧后摇匀 1min; 加入 20  $\mu$ L 粗酶液, 混匀后 8000g 4°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  $\mu$ L, 再加入 40  $\mu$ L 试剂二, 120  $\mu$ L 试剂五, 20  $\mu$ L 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 $\mu$ L 粗酶液, 100 $\mu$ L 试剂三, 置于 37°C 水浴保温 10min; 加入 100 $\mu$ L 试剂四, 盖紧后摇匀 1min; 8000g 4°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  $\mu$ L, 再加入 40 $\mu$ L 试剂二, 120 $\mu$ L 试剂五, 20 $\mu$ 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°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。

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

(2) 按样本质量计算

活性单位定义: 37°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。

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

C 标准品: 标准品浓度, 0.5  $\mu$ 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: 加入反应体系中上清液体积 (mL),

20 $\mu$ L=2 $\times 10^{-2}$ mL; 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°C 可保存一周