

# 胰蛋白酶测试盒说明书

(货号: A080-2 紫外比色法)

**免责声明:** 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

## 一、测定意义:

**增高:** 大多数急性胰腺炎病人及慢性肾功能衰竭病人的胰蛋白酶明显增高,半数以上的胰腺癌及慢性胰腺炎病人的胰蛋白酶也增高。但也有 20% 非胰性腹痛病人,特别是胆囊炎及十二指肠溃疡穿孔病人,胰蛋白酶也会增高

**降低:** 慢性胰腺炎,胆道疾病、慢性胆囊炎等。

## 二、测定原理:

胰蛋白酶 (trypsin) 能催化水解底物精氨酸乙酯的酯链,使其在 253nm 处吸光度值升高,根据吸光度的变化可以计算出酶的活力。

## 三、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂	组分	A080-2-1	A080-2-2	保存
		25 管/24 样	50 管/48 样	
试剂一	底物粉剂	2 支	3 支	2~8℃
	底物稀释液	30mL×2 瓶	30mL×3 瓶	2~8℃
	底物应用液的配制: 临用前将 1 支粉剂加入到 1 瓶稀释液中,充分溶解后使用,现用现配,配好后 2~8℃ 条件下 24 小时内有效。			
试剂二	匀浆介质	60mL×1 瓶	60mL×2 瓶	2~8℃

## 四、所需仪器及试剂:

可调 253nm 波长的紫外分光光度计及 0.5cm 光径石英比色皿 (石英比色皿上一般会有“Q”字样),涡旋混匀器,电子秤,37℃ 水浴锅,试管或离心管,蒸馏水,秒表,各种规格移液器。

## 五、操作过程:

### (一)、样本前处理:

**血清(浆)等液体样本:** 直接取样检测;

**组织样本:** 称取组织,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的试剂二(匀浆介质),冰浴条件下机械匀浆, 2500~4000 转/分,离心 10 分钟,取上清待测。[注] 匀浆液上清需测定其蛋白含量(蛋白含量测定试剂盒本公司有售)

### (二)、简易操作表: (底物应用液提前 5 分钟 37℃ 预温,分光光度计提前 30 分钟开机预热并调波长 253nm,石英比色皿蒸馏水调零)

	空白管	测定管
样本 (mL)		0.015
试剂二 (mL)	0.015	
底物应用液 (mL)	1.5	1.5

样本(或试剂二)与底物应用液混合的同时开始计时,涡旋混匀,倒入 0.5cm 光径的石英比色皿中,蒸馏水调零,于紫外分光光度计 253nm 处测定吸光度值,记下 30 秒时的吸光度值 A<sub>1</sub>; 将比色皿置于比色槽中不动,同时将比色槽温度恒定保持在 37℃ (如果比色槽无法恒温在 37℃,可将比色皿中的反应液倒入预先编号的原试管中,放入 37℃ 水浴箱中水浴,并提前 15 秒取出再次倒入比色皿中),并于 20 分 30 秒时再次测定吸光度值 A<sub>2</sub>,计算  $\Delta A = A_2 - A_1$ 。(a\*为样本加入量,一般为 0.015~0.05mL)

[注]: (1)、在预试过程中,如果  $\Delta A_{\text{测定}} < 0.050$ ,则将样本取样量或样本浓度相应加大后,再次进行测定。

(2)、在预试过程中,如果  $\Delta A_{\text{测定}} > 0.250$ ,则可减少样本加入量或是将样本用匀浆介质(试剂二)稀释后,再次进行测定。

### (三)、详细操作过程:

①、将紫外分光光度计于 253nm 处,0.5cm 光径石英比色皿,用蒸馏水调零;(石英比色皿准备两只,一只用于调零,一只用于测定)。

②、将底物应用液 37℃ 预温 5 分钟以上;

③、往相应编号的试管底部加入 15μL 待测样本,吸取底物应用液 1.5mL 冲入试管中,快速混匀,并计时;(空白管取试剂二 15μL,再吸取底物应用液 1.5mL 冲入试管中,快速混匀,并计时,其它操作与测定管相同)

④、迅速倒入石英比色皿中,紫外分光光度计,253nm 处比色,30 秒时读取吸光度值 A<sub>1</sub>;

⑤、将此反应液倒入原试管中置 37℃ 准确水浴 20 分钟,时间快到时(提前 15 秒左右)取出再迅速倒入石英比色皿中,20 分 30 秒时读取吸光度值 A<sub>2</sub>;(读 A<sub>2</sub> 数之前最好提前将仪器重新调零)

⑥、求出 2 次吸光度差值 ( $\Delta A = A_2 - A_1$ )。

## (四)、酶活力单位定义和计算公式:

### ①、血清(浆)等液体样本:

**单位定义:** 在 pH 8.0, 37℃ 条件下,每毫升血清(浆)中含有的胰蛋白酶每分钟使吸光度变化 0.003 即为一个酶活力单位。

**计算公式:**

$$\text{胰蛋白酶活性 (U/mL)} = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{0.003} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{V_{\text{样}}} \div T$$

### ②、组织样本:

**单位定义:** 在 pH 8.0, 37℃ 条件下,每毫克蛋白中含有的胰蛋白酶每分钟使吸光度变化 0.003 即为一个酶活力单位。

**计算公式:**

$$\text{胰蛋白酶活性 (U/mgprot)} = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{0.003} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div T \div (Cpr \times V_{\text{样}})$$

[注]: 一般条件下,空白管吸光度变化不大;

以上公式中:

V<sub>反应</sub> 为反应体系总体积, 1.515 (mL);

V<sub>样</sub> 为样本取样量, 0.015 (mL);

T 为反应时间, 20min;

Cpr 为匀浆液蛋白浓度, mg/mL。

## 六、灵敏度: 本试剂盒对于样本中胰蛋白酶的检测下限是 3U/ml。

## 附录 I：小鼠肠黏膜反应曲线（仅供参考）

## 1、样本来源：

取新鲜的小鼠肠黏膜，用匀浆介质冰水浴条件下制备成 10% 的匀浆，3500 转/分，离心 10 分钟，取上清待测。

## 2、操作表：

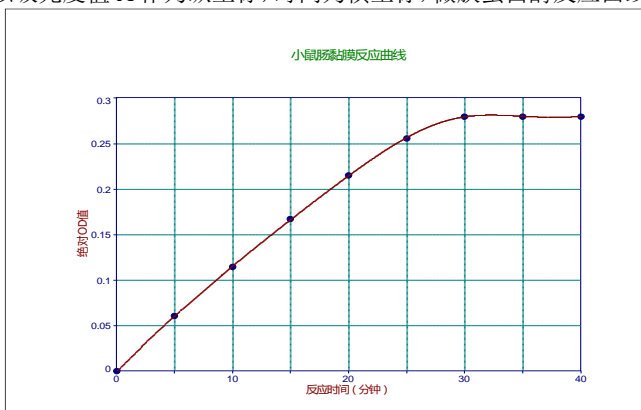
试剂名称	空白管	测定管
胰蛋白酶底物应用液 (mL)	1.5	1.5
37℃ 预温 5 分钟		
10% 小鼠肠黏膜匀浆 (mL)		0.015
样本匀浆介质 (mL)	0.015	

样本与底物应用液混合的同时开始计时，混匀后，倒入 0.5cm 光径的石英比色皿中，于 253nm 处测定吸光度 OD 值，记下 30 秒时的吸光度 OD 值 A<sub>1</sub>；将比色皿置于比色槽中不动，同时将比色槽温度恒定保持在 37℃；如果比色槽无法恒温在 37℃，可将比色皿中的反应液倒入预先编号的原试管中，放入 37℃ 水浴箱中，每隔 5 分钟记录一次吸光度值 A，直至吸光度稳定不变为止。

## 3、测定结果：

时间	反应时间 (分钟)	测定 OD 值	绝对 OD 值
30 秒	0	1.009	0
5 分 30 秒	5	1.070	0.061
10 分 30 秒	10	1.124	0.115
15 分 30 秒	15	1.176	0.167
20 分 30 秒	20	1.224	0.215
25 分 30 秒	25	1.265	0.256
30 分 30 秒	30	1.289	0.280
35 分 30 秒	35	1.289	0.280
40 分 30 秒	40	1.289	0.280

以吸光度值 A 作为纵坐标，时间为横坐标，做胰蛋白酶反应曲线。



（样本曲线是作样本测定前摸索最佳浓度用的，也可根据操作表后的注意点判断样本浓度是否合适）