

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。

自备仪器和样品：

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℃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20μL粗酶液，100μL试剂三，置于37℃水浴保温10min；加入100μL试剂四，盖紧后摇匀1min；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测定管。

注意：空白管和标准管只需要测定一次。

计算公式：

a.使用微量玻璃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：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。

$$\begin{aligned} \text{胃蛋白酶 (Pepsin) 试剂盒说明书 (nmol/min/mg prot)} &= C_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times \text{稀释倍数} \\ &\div (C_{\text{pr}} \times V_1) \div T \\ &= 27500 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{胃蛋白酶活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= C_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times \text{稀释倍数} \div (W \times V_1 \div V_2) \div T \\ &= 27500 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div W \end{aligned}$$

C标准品：标准品浓度，0.5 μmol/mL酪氨酸；稀释倍数：(20+100+100) ÷ 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 μL=2×10⁻²mL；W：组织质量 (g)；V2：粗酶液总体积 (mL)，1mL；T：催化反应时间 (min)，10min。

b.使用96孔板测定的计算公式如下

(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。

$$\begin{aligned} \text{胃蛋白酶活性 (nmol/min/mg prot)} &= C_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times \text{稀释倍数} \div (C_{\text{pr}} \times V_1) \div T \\ &= 27500 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{胃蛋白酶活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= C_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times \text{稀释倍数} \div (W \times V_1 \div V_2) \div T \\ &= 27500 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div W \end{aligned}$$

C标准品：标准品浓度，0.5 μmol/mL酪氨酸；稀释倍数：(20+100+100) ÷ 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 μL=2×10⁻²mL；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°C可保存一周。