（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K843-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(400-410 nm)

Elabscience®胰蛋白酶比色法测试盒

Trypsin Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织样本中的胰蛋白酶(Trypsin)的活力。

检测原理

胰蛋白酶(Trypsin)催化底物生成对硝基苯胺(p-NA),该物质在400-410 nm波长下具有一定量的吸光值。由于p-NA的吸光度与含量成正比，通过测定单位时间内产生的p-NA能够计算胰蛋白酶的酶活力大小。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用BCA法。(货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格1 (Size 1)(48 T)	规格2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	50 mL×1瓶	50 mL×2瓶	-20°C 保存6个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×1支	粉剂×2支	-20°C 避光 保存6个月
试剂三 (Reagent 3)	标准品 (Standard)	粉剂×1支	粉剂×2支	-20°C 避光 保存6个月
试剂四 (Reagent 4)	稀释液 (Diluent)	2 mL×1瓶	4 mL×1瓶	-20°C 保存6个月
	96孔酶标板	48孔×1块	96孔×1块	无要求
	96孔覆膜	2张		
	样本位置标记表	1张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(400-410 nm，最佳检测波长 405 nm)、37°C 恒温箱。

试剂准备

① 检测前，所有的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液配制：

取一支试剂二加入0.5 mL试剂四，溶解混匀，4小时内使用完。

③ 反应工作液配制：

将试剂一:试剂二工作液按体积比=24:1配制，现配现用。

④ 试剂三工作液配制：

取一支试剂三加入1 mL试剂四，溶解混匀，未使用完的试剂可在-20°C避光保存7天。

⑤ 1 mmol/L标准品溶液的配制：

试剂三工作液:试剂一按体积比=1:19配制成1 mmol/L标准品，现配现用，按需配制，4小时内使用完。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	**0**	**0.2**	**0.3**	**0.4**	**0.6**	**0.7**	**0.8**	**1**
1 mmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	120	140	160	200
试剂一(μL)	200	160	140	120	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照样本质量(g)：体积(mL)为1: 9的比例加入匀浆介质(建议取0.1g组织样本，加入900 μL试剂一进行机械匀浆)。 4°C，10000 × g离心10 min，取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：1.86-100.65 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10 %小鼠小肠组织	2-5	10 %大鼠小肠组织	2-5
10%小鼠大肠组织	2-5	10 %大鼠食糜	2-5

注：稀释液为试剂一。

操作步骤

① 标准孔：取 10 μL 不同浓度的标准品溶液，分别加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 10 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

② 向①中标准孔和测定孔中加入 160 μL 反应工作液。

③ 振板 5 s，酶标仪 405 nm 波长下检测测定孔吸光度 A_1。

④ 37°C 孵育 10 min 后，酶标仪 405 nm 波长下检测标准孔吸光度和测定孔吸光度 A_2。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度标准品溶液(μL)	10	--
待测样本(μL)	--	10
反应工作液(μL)	160	160
振板 5 s，酶标仪 405 nm 波长下检测测定孔吸光度 A_1。37°C 孵育 10 min 后，酶标仪 405 nm 波长下检测标准孔吸光度和测定孔吸光度 A_2。		

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax + b

组织样本中胰蛋白酶活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每克组织蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的胰蛋白酶酶量为一个活力单位。

$$\text{胰蛋白酶活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{405} - b) \div a \div T \times f \div C_{pr} \times 1000$$

注解：

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔA_{405}：样本的绝对 OD 值($\Delta A_{405} = A_2 - A_1$)

T：反应时间，10 min

f：样本的稀释倍数

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

1000：1 mmol/L = 1000 μmol/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

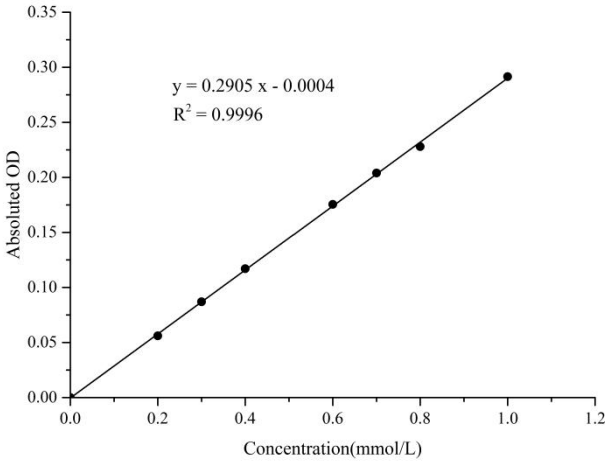
检测范围	1.86-100.65 U/L	**批间差**	7.2-11.2 %
灵敏度	1.86 U/L	**批内差**	3.9-5.1 %
回收率	100-113 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量10 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	**0**	**0.2**	**0.3**	**0.4**	**0.6**	**0.7**	**0.8**	**1**
OD 值	0.366	0.422	0.455	0.483	0.541	0.575	0.591	0.649
	0.368	0.424	0.453	0.485	0.544	0.567	0.599	0.668
平均 OD 值	0.367	0.423	0.454	0.484	0.543	0.571	0.595	0.659
绝对 OD 值	0.000	0.056	0.087	0.117	0.176	0.204	0.228	0.292

② 绘制标曲(如下图)：



附录2 实例分析

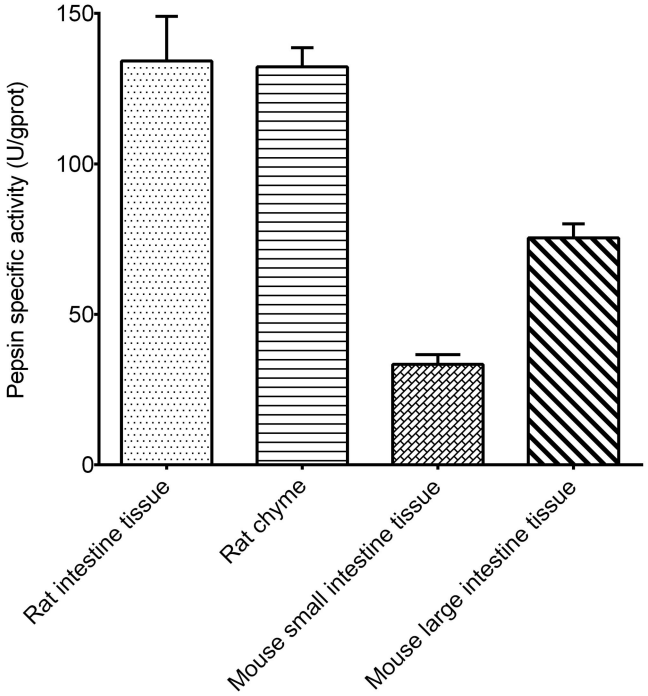
例如检测小鼠小肠组织(数据仅供参考)：

取稀释2.5倍的10%小鼠小肠组织上清液10 μL，按说明书操作，结果如下：标准曲线：$y = 0.2905x - 0.0004$，测定孔A_1值为0.555，测定孔A_2值为0.606，$\Delta A_{405} = A_2 - A_1 = 0.606 - 0.555 = 0.051$，10%小鼠小肠组织匀浆蛋白浓度为1.32 gprot/L，计算结果为：

$$\text{胰蛋白酶活力(U/gprot)} = (0.051 + 0.0004) \div 0.2905 \div 10 \times 2.5 \div 1.324 \times 1000$$

$$= 33.42 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作，测定10%小鼠小肠组织(蛋白浓度为1.32 gprot/L，加样量10 μL)、10%小鼠大肠组织(蛋白浓度为1.22 gprot/L，加样量10 μL)、10%大鼠小肠组织 (蛋白浓度为0.98 gprot/L，加样量10 μL)、10%大鼠食糜(蛋白浓度为1.76 gprot/L，加样量10 μL)中的胰蛋白酶活力(如下图)：



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。