（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-K844-M

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(650-670 nm)

Elabscience®胃蛋白酶比色法测试盒

Pepsin 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胃组织和小肠组织样本的胃蛋白酶(Pepsin)的活力。

检测原理

胃蛋白酶(Pepsin)可催化底物水解，水解产物在碱性条件下与显色剂反应后生成蓝色物质，该蓝色物质在 660 nm 有最大吸收峰，颜色的深浅与胃蛋白酶活性呈正比，可通过 OD 值来计算酶活。

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 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	55 mL×2 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	沉淀剂 (Precipitating Agent)	50 mL×1 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	20 mL×1 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	10 mL×1 瓶	-20ºC 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	底物 (Substrate)	粉剂×2 瓶	-20ºC 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	底物溶剂 (Substrate Solvent)	12 mL×1 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	1 mg/mL 标准品溶液 (1 mg/mL Standard Solution)	1.5 mL×1 支	-20ºC 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	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(650-670 nm，最佳检测波长 660 nm)、37°C 恒温箱

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂五工作液的配制：

取一瓶试剂五，加入5 mL试剂六，75°C水浴约30 min溶解完全，2-8°C可保存1-2天。

③ 60 μg/mL标准品溶液的配制：

将试剂一：试剂七按体积比= 47：3混匀，现配现用。

④ 测定工作液配制：

将试剂一：试剂五工作液按体积比=39：25混匀，现配现用。

⑤ 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(μg/mL)	**0**	**12**	**18**	**24**	**36**	**42**	**48**	**60**
60 μg/mL 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

按照组织样本质量(g)：生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL)=1：4的比例匀浆，4ºC，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：0.63-94.98 U/mL，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
20 %小鼠胃组织	不稀释	20 %大鼠胃组织	不稀释
20%小鼠小肠组织	不稀释	20 %大鼠小肠组织	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

试剂五工作液加热约 10-15min 后，需用涡旋仪混匀后再进行加热，方能溶解完全。

操作步骤

酶促反应：

① 测定管：取 40 μL 样本加入 2 mL EP 管中。

对照管：取 40 μL 样本加入 2 mL EP 管中。

② 向①中对照管中加入 400 μL 试剂二。

③ 向①中各管加入 200 μL 测定工作液，混匀，37°C 孵育 10 min。

④ 向③中测定管中加入 400 μL 试剂二。

⑤ 混匀各管，37°C 孵育 10 min，3500 转/min 离心 10 min，取上清倒入 2 mL 新的 EP 管中，混匀待用。

显色反应：

① 标准孔：取 60 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、对照孔：取 60 μL 酶促反应上清液加入相应的酶标孔中。

② 向①中各管加入 150 μL 试剂三。

③ 向②中各管加入 60 μL 试剂四。

④ 振板 5 s，37°C 孵育 10 min，酶标仪 660 nm 波长下测定各孔吸光度。

操作表

酶促反应：

	测定管	对照管
样本(μL)	40	40
试剂二(μL)	--	400
测定工作液(μL)	200	200
混匀，37℃孵育 10 min		
试剂二(μL)	400	--
混匀各管，37ºC 孵育 10 min，3500 转/min 离心 10 min，取上清倒入 2 mL 新的 EP 管中，混匀待用。		

显色反应：

	标准孔	测定孔	对照孔
酶促反应上清液(μL)	--	60	60
不同浓度标准品溶液(μL)	60	--	--
试剂三(μL)	150	150	150
试剂四(μL)	60	60	60
振板 5 s，37ºC 孵育 10 min，酶标仪波长 660 nm 下测定各孔吸光度。			

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

组织样本中胃蛋白酶活力计算公式：

定义： 37°C 条件下，每毫克组织蛋白每分钟催化底物产生 1 μg 的产物所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{胃蛋白酶活力 (U/mgprot)} = (\Delta A_{660} - b) \div a \div T \times f \times \frac{V_1}{V_2} \div C_{pr}$$

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_{660}：样本的绝对 OD 值（$\Delta A_{660} = A_{测定} - A_{对照}$）

T：反应时间，10 min

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

V_1：酶促反应液总体积，0.64 mL

V_2：酶促反应中样本用量，0.04 mL

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度(mgprot/mL)

附录1 关键数据

1. 技术参数

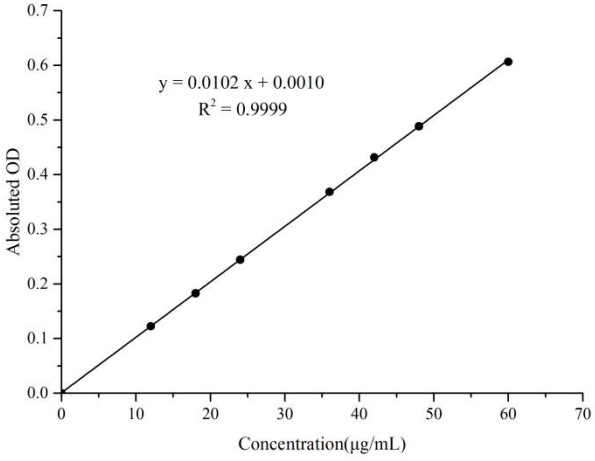
检测范围	0.63-94.98 U/mL	**批间差**	4.8-5.6 %
灵敏度	0.63 U/mL	**批内差**	1.3-2.2 %
回收率	93-98 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量60 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 (μg/mL)	**0**	**12**	**18**	**24**	**36**	**42**	**48**	**60**
OD 值	0.041	0.163	0.222	0.285	0.411	0.476	0.530	0.647
	0.041	0.164	0.226	0.286	0.408	0.469	0.529	0.648
平均 OD 值	0.041	0.164	0.224	0.286	0.410	0.473	0.530	0.648
绝对 OD 值	0	0.123	0.183	0.245	0.369	0.432	0.489	0.607

② 绘制标曲(如下图)：



附录2 实例分析

例如检测大鼠胃组织样本(数据仅供参考)：

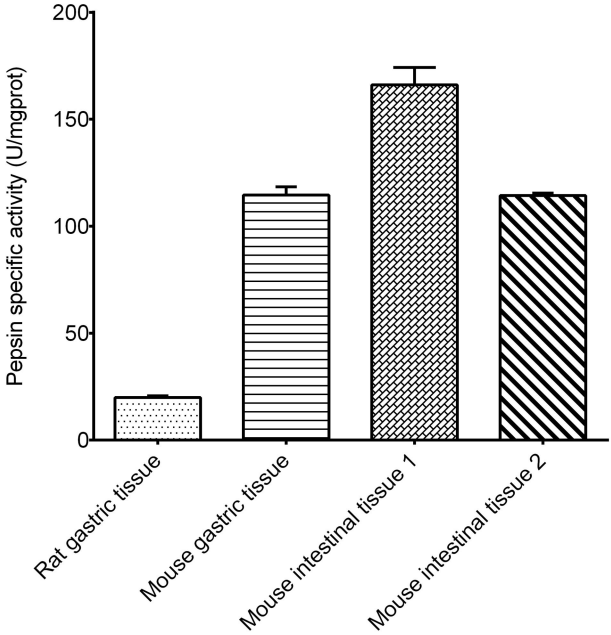
取20 %大鼠胃组织样本40 μL，按操作表操作，结果如下：

标准曲线：y = 0.0102 x + 0.0010，对照孔平均OD值$A_{对照}$为0.379，测定孔平均OD值$A_{测定}$为0.414，$\Delta A_{660} = A_{测定} - A_{对照} = 0.414 - 0.379 = 0.035$，测定出20%大鼠胃组织的蛋白含量为0.268 mgprot/mL，计算结果为：

$$胃蛋白酶活力(U/mgprot) = (0.035 - 0.0010) \div 0.0102 \div 10 \times 1 \times \frac{0.64}{0.04} \div 0.268$$

$$= 19.9\ U/mgprot$$

按说明书操作，测定大鼠胃组织(20%组织匀浆蛋白含量为0.268 mgprot/mL，不稀释，加样量40 μL)、小鼠胃组织(20%组织匀浆蛋白含量为0.251 mgprot/mL，不稀释，加样量40 μL)、小鼠小肠组织1(20%组织匀浆蛋白含量为0.216 mgprot/mL，不稀释，加样量40 μL)、小鼠小肠组织2(20%组织匀浆蛋白含量为0.281 mgprot/mL，不稀释，加样量40 μL)中的胃蛋白酶活力(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。