胰蛋白酶检测试剂盒（BAPNA 法）

货号：PMK1933

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/48S　96T/96S

适用样本：动物组织、血清（浆）等液体样本

产品简介

胰蛋白酶（EC 3.4.4.4），是蛋白酶的一种，从牛、羊、猪的胰脏提取的一种丝氨酸蛋白水解酶。在脊椎动物中，作为消化酶而起作用。胰蛋白酶选择性水解变性蛋白质中由赖氨酸或精氨酸的羧基所构成的肽链，是一种重要的消化酶。此外，胰蛋白酶还广泛应用于脓胸、血胸、外科炎症、溃疡、创伤性损伤等所产生的局部水肿、血肿及脓肿等的辅助治疗。本试剂盒提供了一种简单、快速的胰蛋白酶检测方法，其检测原理是：胰蛋白酶催化底物 BAPNA 生成对硝基苯胺(p-NA)，该物质在 405nm 波长下有特征吸收峰。由于 p-NA 的吸光度值与含量成正比，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性大小。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	60mL	120mL	4℃保存
反应缓冲液	15mL	30mL	4℃保存
试剂一	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂二	1mL	2mL	4℃保存
pNA 标准品(10mM)	1mL	1mL	4℃保存

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 405nm 处的吸光度）
水浴锅、制冰机、低温离心机
96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
去离子水
匀浆器

试剂准备

提取液：即用型；4℃保存。
反应缓冲液：即用型；使用前平衡到室温；4℃保存。
试剂一：临用前每支加 0.5mL 试剂二；充分溶解；用不完的试剂分装-20℃保存，避免反复冻融。
试剂二：即用型；使用前平衡到室温；4℃保存。
工作液：临用前将反应缓冲液和溶解后的试剂一按 18：1 的比例配制工作液，比如：180μL 反应缓冲液加 10μL 试剂一，每孔需要 190μL 工作液。工作液需现配现用，根据需要测定的样本数按比例配制。
标准曲线设置：取 400μL pNA 标准品(10mM)用 600μL 反应缓冲液稀释至 4mM pNA 标准品。用 4mM pNA 按下表所示，进行下一步稀释：

	标准品体积	反应缓冲液体积（μL）	浓度（mM）
Std.1	1000μL of 4mM pNA	0	4
Std.2	500μL of Std.1	500	2

Std.3	500μL of Std.2	500	1
Std.4	500μL of Std.3	500	0.5
Std.5	500μL of Std.4	500	0.25
Std.6	500μL of Std.5	500	0.125
Std.7	500μL of Std.6	500	0.0625

注意：每次实验，请使用新配制的标准品。用不完的标准品-20℃避光分装保存，避免反复冻融

样本制备

动物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，10,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）。或者直接称取 1mg 酶粉，加 1mL 提取液，充分混匀后置冰上待测。

血清（浆）等液体样本：直接测定。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 405nm，可见光分光光度计去离子水调零。
2. 工作液置于 37℃水浴保温 10min。
3. 样本测定（在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入下列试剂）：

试剂名称	空白孔（μL）	标准孔（μL）	测定孔（μL）
样本	0	0	10
标准品	0	200	0
反应缓冲液	200	0	0
工作液	00	0	190

混匀后立刻测定 405nm 处吸光度 A_1，37℃避光孵育 20min 后，测定 405nm 处吸光度 A_2。计算 $\Delta A_{标}=A_{标1}-A_{空1}$；$\Delta A_{测}=A_{测2}-A_{测1}$（空白和标准曲线只需做 1 次）。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 $\Delta A_{测}$ 小于 0.005 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{测}$ 大于 1.5，样本可用去离子水进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准液浓度为 y 轴，$\Delta A_{标}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将 $\Delta A_{测}$ 带入方程得到 y 值（1mM=1μmol/mL）。

2. 样本胰蛋白酶活性计算

（1）按照样本质量计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化水解 BAPNA 生成对 1μmol p-NA 为 1 个酶活单位。

胰蛋白酶活性（U/g 鲜重）= $y\times V_{反总}\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\div T\times n=y\div W\times n$

2.按照蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化水解 BAPNA 生成对 1μmol p-NA 为 1 个酶活单位。

胰蛋白酶活性（U/mg prot）= $y\times V_{反总}\div(V_{样}\times Cpr)\div T\times n=y\div Cpr\times n$

3.按照液体体积计算

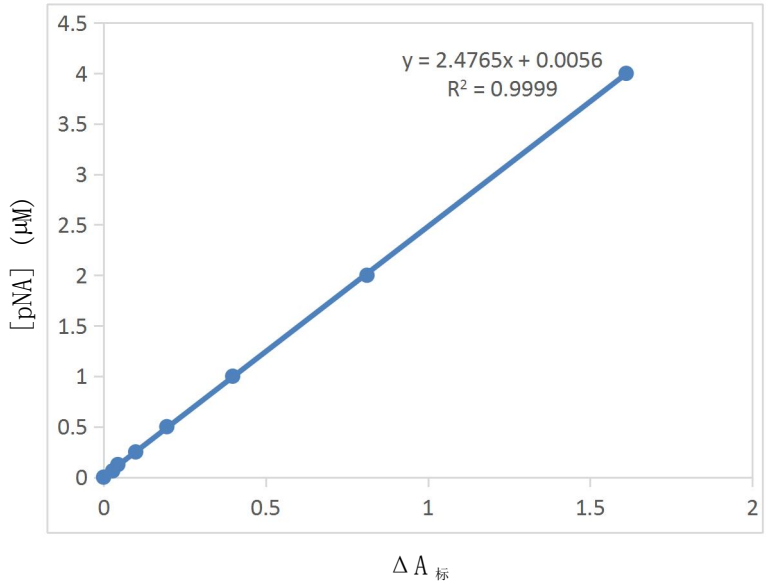
单位的定义：每 mL 样品在反应体系中每分钟催化水解 BAPNA 生成对 1μmol p-NA 为 1 个酶活单位。

胰蛋白酶活性（U/mL）=$y\times V_{反总}\div V_{样}\div T\times n=y\times n$

$V_{反总}$：反应体系总体积，0.2mL；W：样本质量，g；$V_{样}$：加入样本体积，0.01mL；$V_{样总}$：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，20min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；n：样本稀释倍数。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1131 酸性蛋白酶检测试剂盒（微量法）
PMK1132 中性蛋白酶检测试剂盒（微量法）
PMK1096 碱性磷酸酶（AKP/ALP）检测试剂盒（微量法）
PMK1094 乙酰胆碱酯酶（AchE）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：