

胰蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法)

产品编号	产品名称	包装
P0325S	胰蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法)	100次
P0325M	胰蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法)	500次

产品简介:

- 碧云天研发的胰蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法) (Fluorometric Trypsin Activity Assay Kit, or Trypsin Activity Fluorometric Assay Kit), 也称胰酶活性检测试剂盒, 是一种利用荧光法, 快速、高灵敏地对血清、血浆、尿液等生物体液、组织、细胞、纯化蛋白等样品中胰蛋白酶(Trypsin)活性进行检测的试剂盒。
- 胰蛋白酶(EC 3.4.21.4)由Wilhelm Kühne于1876年发现, 是PA家族(蛋白酶超家族A)的一种胰腺酶, 属于丝氨酸蛋白酶S1家族, 具有切割蛋白质肽键的功能[1]。胰蛋白酶以原酶形式(胰蛋白酶原)在胰脏中合成, 作为胰腺的外分泌液成分而分泌, 在小肠中经肠激酶或胰蛋白酶的限制分解形成活化的胰蛋白酶。经活化的胰蛋白酶可以活化更多的胰蛋白酶原, 这种过程称为自动催化。胰蛋白酶的主要作用是将蛋白质水解为肽, 进而分解为氨基酸, 发挥消化酶的作用, 这一过程是机体消化蛋白质的必要过程, 其主要作用机制是选择性地多肽链中赖氨酸(Lysine)或精氨酸(Arginine)残基中的羧基侧切断。此外, 胰蛋白酶还能限制分解糜蛋白酶原、羧肽酶原、磷脂酶原等其它酶的前体, 起活化作用。胰蛋白酶的非正常激活可导致胰腺炎[2]。因此, 胰蛋白酶是胰腺炎的一个重要的生物标志物。胰蛋白酶常用于消化贴壁细胞、蛋白质谱分析前的消化、分解牛奶中的酪蛋白以生产低致敏食品等。因此, 胰蛋白酶活性的监测在生物化学、制药和临床应用中都具有重要意义。
- 胰蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法)采用荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)的方法, 其检测原理如图1所示。MCA是荧光供体(Donor), Dnp是荧光受体(Acceptor)或称为淬灭基团(Quencher), 这两个荧光基团的吸收光谱有一定的重叠, 当这两个荧光基团间的距离合适时(一般7-10nm), 荧光能量由供体向受体转移, 导致供体荧光分子自身的荧光强度衰减。MCA和Dnp被连接到胰蛋白酶底物(Trypsin Substrate)的两端。当胰蛋白酶底物没有被切割时, 两个基团足够接近, 发生荧光共振能量转移, 即Dnp可淬灭MCA的荧光而导致检测不到荧光; 当该底物被胰蛋白酶切割后, 多肽的首尾两端分离, 两个基团分开, MCA的荧光不再被Dnp淬灭, 即可检测到MCA的荧光, 这样通过荧光检测就可以非常灵敏地检测胰蛋白酶的酶活性。MCA的最大激发波长为325nm, 最大发射波长为393nm。

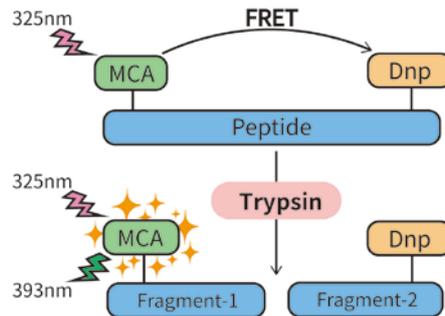


图1. 碧云天胰蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法) (P0325)检测原理图。

- 本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。**本试剂盒灵敏度高, 可检测低至约 $2\mu\text{U}$ 的胰蛋白酶活性。96孔板中通常1-10 μl 细胞或组织样品足够用于胰蛋白酶活性检测。本试剂盒内提供了MCA Standard, 在0.1-2nmol (即1-20 μM)范围内有良好的线性关系。可以通过设置标准曲线(图2A), 计算出样品中胰蛋白酶的活性。本试剂盒同时提供胰蛋白酶及类胰蛋白酶丝氨酸蛋白酶抑制剂TLCK, 以排除其它酶的干扰(图2B)。本试剂盒用于小鼠小肠的胰蛋白酶活性检测效果参考图2C。

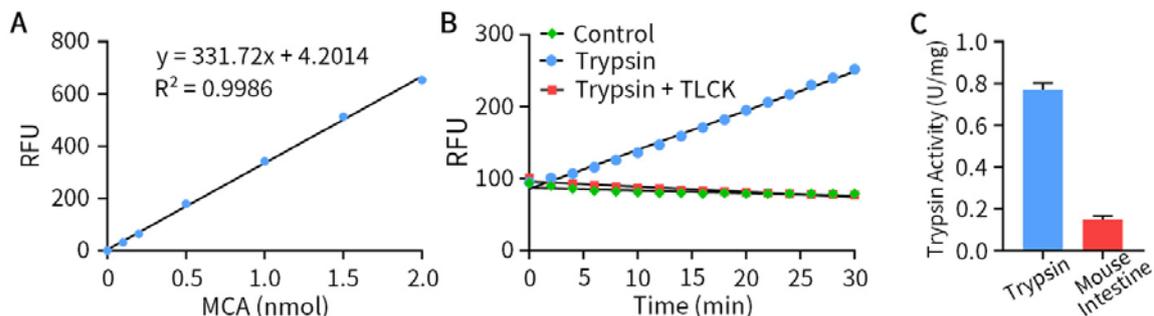


图2. 碧云天胰蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法) (P0325)检测MCA标准品的标准曲线、胰蛋白酶及小鼠小肠组织样品的检测效果图。本试剂盒检测MCA标准品的标准曲线示意图见图A。含胰蛋白酶抑制剂(Trypsin+TLCK)和不含抑制剂的胰蛋白酶(Trypsin)酶切Trypsin Substrate 30分钟,生成产物的荧光强度见图B。小鼠小肠组织(蛋白量为1.8μg)和20ng胰蛋白酶的酶活检测效果图见图C。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异,图中数据仅供参考。

- 本试剂盒使用灵活,检测速度快,适用范围广。本试剂盒中提供了重组胰蛋白酶作为阳性对照(Positive Control),便于检测体系的建立。本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆以及肺、肠、肝脏等组织或细胞样品的检测。不仅适合少量样品的检测,也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。本试剂盒采用一步法检测,简单快速,全程约0.5-1小时即可完成。
- 胰蛋白酶也被简称为胰酶(Pancreatin),而常用的动物来源的胰酶实际上是猪、羊或牛胰中提取的多种酶的混合物,包含胰蛋白酶(Trypsin)、糜蛋白酶(Chymotrypsin)、胰弹性蛋白酶(Pancreatic elastase)、羧肽酶B(Carboxypeptidase B)等[3]。
- 本试剂盒提供的Assay Buffer通用性强,可直接用于裂解细胞或动物组织样品用于检测胰蛋白酶活性。用于96孔板检测时,本试剂盒小包装可以进行100次检测,中包装可以进行500次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P0325S-1	Assay Buffer	20ml
P0325S-2	Recombinant Trypsin (1mg/ml)	20μl
P0325S-3	Trypsin Substrate	200μl
P0325S-4	MCA Standard (10mM)	20μl
P0325S-5	TLCK (40mM)	50μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0325M-1	Assay Buffer	100ml
P0325M-2	Recombinant Trypsin (1mg/ml)	50μl
P0325M-3	Trypsin Substrate	1ml
P0325M-4	MCA Standard (10mM)	100μl
P0325M-5	TLCK (40mM)	250μl
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存,一年有效。其中Trypsin Substrate、MCA Standard (10mM)须避光保存。

注意事项:

- Assay Buffer、Trypsin Substrate和MCA Standard (10mM)需完全解冻并平衡至室温后再使用,否则会影响检测结果,使用完毕后各试剂应立即按照试剂盒要求的条件保存。
- 请确保样品pH值在7-8之间,或加入样品后反应体系的pH值在7-8之间,否则可能会影响检测结果的信号值和稳定性。体积较小的试剂首次使用时建议先离心数秒使液体沉降于管底,然后再使用。结冻的试剂必须完全融化并混匀后使用。
- 细胞、组织等裂解样品如果置于4°C保存,用于胰蛋白酶活性检测时,保存的时间不应超过2天,否则会影响检测结果的准确性。通常细胞、组织等裂解样品宜在-20°C保存,-80°C保存更佳。
- 样品中如果有基质金属蛋白酶3 (MMP-3)、基质金属蛋白酶10 (MMP-10)、胰凝乳蛋白酶等蛋白酶,可能会对酶活性的检测产生一定的影响,可加入试剂盒中的胰蛋白酶及类胰蛋白酶丝氨酸蛋白酶抑制剂TLCK进行确认或作为样品背景对照。
- 检测时建议使用96孔黑板,推荐选购碧云天的BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖,独立包装) (FCP966)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品,不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 样品的准备。

- 血液样品的准备:对于血清样品,将全血在常温如25°C下放置30分钟-2小时,不要剧烈摇晃以免溶血,待全血自然凝固并析出血清后,4°C约1000-2000×g离心10分钟,取黄色上清即得血清,注意不要吸取白色或淡黄色沉淀;对于血浆样品,将全血用肝素或者EDTA进行抗凝,4°C约1000-2000×g离心10分钟,取黄色或淡黄色上清即得血浆,注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上,如果不能立即检测,也可以分装并短期保存于-20°C或-80°C。对于冻存的样品,在检测前解冻后冰浴存放备用,使用前必须混匀。
- 细胞或组织样品的准备:对于培养的贴壁细胞,PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞,先适当离心(如100-500×g,5分钟)收集细胞到离心管内,弃上清并吸净残留液体。按照每100万细胞加入100-200μl的比例加入Assay Buffer,适当吹打,冰浴5-10分钟以充分裂解细胞。4°C约12,000×g离心3-5分钟,取上清用于后续检测。对于组织样品,按

照每10mg组织加入100 μ l Assay Buffer的比例，使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml \times 48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600/E6607)或玻璃匀浆器在约4°C或冰浴等低温条件下进行匀浆。4°C约12,000 \times g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4°C或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20°C或-80°C冻存。

- c. 尿液样品可直接用于检测。
- d. 推荐使用碧云天BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0012)或Bradford蛋白浓度测定试剂盒(去垢剂兼容型) (P0006C)对准备好的样品进行蛋白浓度检测。测得的样品蛋白浓度记录为C。

2. 试剂盒的准备。

融解Assay Buffer、Trypsin Substrate和MCA Standard，平衡至室温后混匀备用。Recombinant Trypsin (1mg/ml)存放于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。

3. 样品测定。

a. MCA 标准曲线的设置。

取2 μ l MCA Standard (10mM)，加入998 μ l Assay Buffer，混匀，配制成1ml浓度为20 μ M的MCA标准溶液。分别取20 μ M的MCA标准溶液0、5、10、25、50、75、100 μ l加入96孔板的标准品孔中，并用Assay Buffer补足至100 μ l (或采用倍比稀释的方式配制标准溶液)，此时，标准曲线各孔MCA的浓度和物质的量分别为0、1、2、5、10、15、20 μ M或0、0.1、0.2、0.5、1、1.5、2nmol。

注：初次检测，可以按照以上浓度设置标准曲线。在后续的实验中，可以根据样品中胰蛋白酶的活性对标准品的浓度范围进行适当调整。

b. 阳性对照的设置。

取适量的Recombinant Trypsin (1mg/ml)，用Assay Buffer将其500倍稀释。例如取2 μ l Recombinant Trypsin (1mg/ml)，加入998 μ l的Assay Buffer，颠倒混匀，即为2 μ g/ml的Recombinant Trypsin。用作阳性对照时，每孔使用10 μ l，即20ng/孔。阳性对照可根据样品中胰蛋白酶的活性调整稀释倍数。

注：Recombinant Trypsin Unit约为800USP/mg。本阳性对照Recombinant Trypsin因为保存稳定性方面的原因，仅宜用于验证试剂盒是否正常工作，不宜用于样品中胰蛋白酶活性的定量。样品中胰蛋白酶活性的计算须按照步骤3g进行。

c. 取 1-10 μ l 样品或稀释后的样品至 96 孔板样品孔中，并相应地加入 Assay Buffer 补足至 98 μ l。同时设置仅含 Assay Buffer 的孔为空白对照孔。

注1：为确保样品的检测数值在标准曲线范围内，建议样品同时设定多个稀释倍数，可以进行预实验确定样品的大致浓度，如果数值不在标准曲线范围内，可调整样品的稀释倍数或者增加样品的量。样品总稀释倍数记为n (例如本步骤中对样品进行了2倍稀释，加入的‘稀释后的样品’为5 μ l，则n=2 \times 10/5=4)。

注2：为获得更加可靠的检测结果，推荐每个样品设置平行孔或3个复孔。

注3：(选做)样品中如果有基质金属蛋白酶3 (MMP-3)、基质金属蛋白酶10 (MMP-10)、胰凝乳蛋白酶等蛋白酶，可能会对酶活性的检测产生一定的影响，此时可加入TLCK进行确认或作为样品背景对照。具体配制方法参考下表。混匀后，室温放置10分钟。后续计算Fn时需要先用Sample组的荧光值减去Sample Background的荧光值。

Reagent	Blank Control	Sample Background	Sample Group
Sample (1-10 μ l)	-	X μ l	X μ l
TLCK (40mM)	-	2 μ l	-
DMSO	2 μ l	-	2 μ l
Assay Buffer	To 98 μ l	To 98 μ l	To 98 μ l

d. 除 MCA 标准曲线外的其余各孔中加入 Trypsin Substrate 工作液 2 μ l，混匀。

e. 立即使用适当的酶标仪，激发波长为 325nm、发射波长为 393nm。此时记录初始读值为 F1。

f. 37°C 反应 10-30 分钟，反应时间记录为 T，通常每 2 分钟或 5 分钟测定一次荧光值，第 n 次的荧光读数记为 Fn。荧光的增强取决于胰蛋白酶水解底物后生成的 MCA 的量， $\Delta F=Fn-F1$ 。

注：为取得最佳的检测结果，反应时间可以根据待测样品中的胰蛋白酶活性进行调整，但必须确保读数在标准曲线的线性范围之内。对于胰蛋白酶活性较高的样品，建议测定总时间为20或30分钟，对应的测定间隔时间设为2分钟或5分钟。对于胰蛋白酶活性较低的样品，可以延长测定总时长为1小时，对应的测定间隔时间设为10或20分钟；也可以连续测定30分钟，每隔1或2分钟测定一次。最后取反应开始后呈线性的时间点范围内的数据用于分析或计算。

g. 建立 MCA 标准曲线，将 ΔF 代入标准曲线，即可计算出反应时间内样品中胰蛋白酶催化产生的 MCA 的量(记为 Sa)。MCA 标准曲线可以参考图 2A，在 0.1-2nmol 范围内有良好的线性关系。胰蛋白酶活性计算公式如下：

$$\text{Trypsin Activity (nmol/min/mg或mU/mg)} = Sa \times n / (T \times V_{\text{sample}} \times C)$$

注：Sa为步骤3g根据标准曲线确定的MCA的生成量(nmol)；

n为步骤3c样品总稀释倍数；

T为步骤3f的反应时间(min)；

V_{sample} 为反应体系中样品的体积，本反应体系中样品的体积为0.01ml。

C为步骤1d中样品蛋白浓度(mg/ml)。

胰蛋白酶的活力定义：在适宜的温度、pH和反应体系中，在底物较为充裕的情况下，1分钟内可以催化生成1 μ mol MCA的胰蛋白酶的活力，定义为一个胰蛋白酶酶活力单位(Unit, U)。

注：文献中胰蛋白酶的酶活性定义可能会因为酶活力测定方法的不同而有较大的区别。

计算示例：

MCA生成量(Sa)=0.506nmol；

样品总稀释倍数(n)=4；

反应时间(T)=30min；

C=1mg/ml；

Trypsin Activity=0.506×4/(0.01×30×1)=6.75nmol/min/mg，或6.75mU/mg。

参考文献：

1. Kaur J, Singh PK. 2022. 52(5):949-967.
2. Hirota M, Ohmuraya M, Baba H. J Gastroenterol. 2006. 41(9):832-6.
3. EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP), et al. EFSA J. 2021. 19(1):e06368.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P0324	胰蛋白酶活性检测试剂盒(显色法)	100次/500次
P0325	胰蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法)	100次/500次
P0338	基质金属蛋白酶3 (MMP-3)活性荧光检测试剂盒	100次/500次
P0403	蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法)	100次/500次

Version 2025.01.03