

蔗糖酶 (sucrase) 试剂盒说明书

微量法 100管/48样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

蔗糖酶 (EC 3.2.1.26) 是碳水化合物消化吸收的关键酶之一，能够水解蔗糖变成相应的单糖而被机体吸收。

测定原理：

本试剂盒采用3,5-二硝基水杨酸法测定蔗糖酶催化产生的还原糖的含量，由此可得出蔗糖酶水解速度。其原理是3,5-二硝基水杨酸与还原糖共热被还原成棕红色的氨基化合物，在一定范围内还原糖的量和反应液的颜色深度成正比。此法操作简便、迅速、杂质干扰较小。

所需的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、沸水浴、移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存；

试剂一：液体2mL×1瓶，4°C保存；

试剂二：粉剂×1支，4°C保存，用时加入1mL蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂4°C保存；

试剂三：液体3mL×1瓶，常温保存；

样品测定的准备：

按照组织质量 (g)：提取液体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4°C离心10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至520nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定，（在EP管中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
试剂一	15	15
蒸馏水	15	
样本	30	30
试剂二		15

置于25°C准确水浴10min

试剂三	30	30
-----	----	----

混匀，95°C水浴5min左右（盖紧，防止水分散失），冷却至室温

蒸馏水	210	210
-----	-----	-----

混匀，取200 $\mu$ L至微量石英比色皿或96孔板中测定各管520nm吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ，每个测定管需设一个对照管。

蔗糖酶活力计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.1296x - 0.12$ ；x为标准品浓度（mg/mL），y为吸光值。

2、按照蛋白浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白每分钟催化水解1 $\mu$ g蔗糖定义为一个酶活力单位。

蔗糖酶活力( $\mu$ g/min/mg prot)=[ $1000 \times (\Delta A + 0.12) \div 0.1296 \times V_1$ ] $\div$ ( $V_1 \times C_{pr}$ ) $\div$ T= $771 \times (\Delta A + 0.12) \div C_{pr}$ 。

3、按样本鲜重计算

单位定义：每g组织每分钟催化水解1 $\mu$ g蔗糖定义为一个酶活力单位。

蔗糖酶活力( $\mu$ g/min/g鲜重)=[ $1000 \times (\Delta A + 0.12) \div 0.1296 \times V_1$ ] $\div$ ( $W \times V_1 \div V_2$ ) $\div$ T= $771 \times (\Delta A + 0.12) \div W$ 。

1000: 1mg/mL=1000 $\mu$ g/mL; V<sub>1</sub>: 加入反应体系中样本体积, 0.03mL; V<sub>2</sub>: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 10min; C<sub>pr</sub>: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本鲜重, g。

b.用96孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.0648x - 0.12$ ；x为标准品浓度（mg/mL），y为吸光值。

2、按照蛋白浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白每分钟催化水解1 $\mu$ g蔗糖定义为一个酶活力单位。

蔗糖酶活力( $\mu$ g/min/mg prot)=[ $1000 \times (\Delta A + 0.12) \div 0.0648 \times V_1$ ] $\div$ ( $V_1 \times C_{pr}$ ) $\div$ T= $1542 \times (\Delta A + 0.12) \div C_{pr}$ 。

3、按样本鲜重计算

单位的定义：每g组织每分钟催化水解1 $\mu$ g蔗糖定义为一个酶活力单位。

蔗糖酶活力( $\mu$ g/min/g鲜重)=[ $1000 \times (\Delta A + 0.12) \div 0.0648 \times V_1$ ] $\div$ ( $W \times V_1 \div V_2$ ) $\div$ T= $1542 \times (\Delta A + 0.12) \div W$ 。

1000: 1mg/mL=1000 $\mu$ g/mL; V<sub>1</sub>: 加入反应体系中样本体积, 0.03mL; V<sub>2</sub>: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 10min; C<sub>pr</sub>: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本鲜重, g。