

蔗糖酶 (sucrase) 检测试剂盒 (微量法)

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 2mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 支，4℃ 保存，用时加入 1mL 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂 4℃ 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℃ 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℃ 准确水浴 10min

试剂三	30	30
混匀，95℃ 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 200μL 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 μ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{蔗糖酶活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.12) \div 0.1296 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 771 \times (\Delta A + 0.12) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算

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

$$\begin{aligned} \text{蔗糖酶活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.12) \div 0.1296 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 771 \times (\Delta A + 0.12) \div W \end{aligned}$$

1000: 1mg/mL=1000 μ g/mL;

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.03mL;

V2: 加入提取液体积, 1mL;

T: 反应时间, 10min;

Cpr: 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 μ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{蔗糖酶活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.12) \div 0.0648 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 1542 \times (\Delta A + 0.12) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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 μ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{蔗糖酶活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [1000 \times (\Delta A + 0.12) \div 0.0648 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \div T \\ &= 1543 \times (\Delta A + 0.12) \div W \end{aligned}$$

1000: 1mg/mL=1000 μ g/mL;

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.03mL;

V2: 加入提取液体积, 1mL;

T: 反应时间, 10min;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

W: 样本鲜重, g。