

## 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℃ 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 1μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

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

3、按样本鲜重计算

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

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

1000:  $1\text{mg}/\text{mL} = 1000\mu\text{g}/\text{mL}$ ; V1: 加入反应体系中样本体积,  $0.03\text{mL}$ ; V2: 加入提取液体积,  $1\text{mL}$ ; T: 反应时间,  $10\text{min}$ ; Cpr: 样本蛋白质浓度,  $\text{mg}/\text{mL}$ ; 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 ( $\text{mg}/\text{mL}$ ), 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  $1\mu\text{g}$  蔗糖定义为一个酶活力单位。

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

3、按样本鲜重计算

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

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

1000:  $1\text{mg}/\text{mL} = 1000\mu\text{g}/\text{mL}$ ; V1: 加入反应体系中样本体积,  $0.03\text{mL}$ ; V2: 加入提取液体积,  $1\text{mL}$ ; T: 反应时间,  $10\text{min}$ ; Cpr: 样本蛋白质浓度,  $\text{mg}/\text{mL}$ ; W: 样本鲜重, g。