

## 植物蔗糖酶(sucrase)检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-ZT014 微板法 96 样)

有效期: 3 个月

### 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、可调式移液器、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 瓶, 4℃ 保存, 用时每瓶加入 2mL 蒸馏水充分溶解, 现配先用;

试剂三: 液体 3mL×1 瓶, 常温避光保存;

### 样品测定的准备:

称取约 0.1g 组织加入 1mL 提取液, 冰浴中匀浆。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 1.5mL 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	30	
样本		30
试剂二	15	15

置于 25℃ 准确水浴 10min

试剂三	30	30
-----	----	----

混匀, 100℃ 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,  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ , 对照管只要做一管。

### 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

标准条件下测定的回归方程为  $y = 0.1296x - 0.1201$ ;  $x$  为标准品浓度 (mg/mL),  $y$  为吸光值。

1、按照蛋白浓度计算

单位定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

蔗糖酶活力 ( $\mu\text{g} / \text{mg prot}$ ) =  $1000 \times (\Delta A + 0.1201) \div 0.1296 \div T \div C_{\text{pr}} = 772 \times (\Delta A + 0.1201) \div C_{\text{pr}}$

## 2、按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1 $\mu$ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

蔗糖酶活( $\mu$ g /g 鲜重) =  $1000 \times (\Delta A + 0.1201) \div 0.1296 \div T \div (W \div V \text{ 样总}) = 772 \times (\Delta A + 0.1201) \div W$ 。

T: 反应时间, 10min; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

W: 样本鲜重, g; 1000: 1mg/mL=1000  $\mu$  g/ml。

### b.用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为  $y = 0.0648x - 0.1201$ ; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为吸光值。

#### 1、按照蛋白浓度计算

单位定义:每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1 $\mu$ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

蔗糖酶活力 ( $\mu$ g /mg prot) =  $1000 \times (\Delta A + 0.1201) \div 0.0648 \div T \div Cpr = 1543 \times (\Delta A + 0.1201) \div Cpr$ 。

#### 2、按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1 $\mu$ g 蔗糖定义为一个酶活力单位。

蔗糖酶活力( $\mu$ g/g 鲜重) =  $1000 \times (\Delta A + 0.1201) \div 0.0648 \div T \div (W \div V \text{ 样总}) = 1543 \times (\Delta A + 0.1201) \div W$ 。

T: 反应时间, 10min; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

W: 样本鲜重, g; 1000: 1mg/mL=1000  $\mu$  g/ml。