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，ΔA=A 测定-A 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(μg/min/mg prot)=[1000×(ΔA+0.12)÷0.1296×V1]÷(V1×Cpr)÷T=771×(ΔA +0.12)÷Cpr。

3、按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟催化水解 1μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

蔗糖酶活力(μg/min/g 鲜重)=[1000×(ΔA+0.12)÷0.1296×V1]÷(W×V1÷V2)÷T=771×(ΔA +0.12)÷W。

1000：1mg/mL=1000μg/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 1μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

蔗糖酶活力(μg/min/mg prot)=[1000×(ΔA+0.12)÷0.0648×V1]÷(V1×Cpr)÷T=1542×(ΔA +0.12)÷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 1μg 蔗糖定义为一个酶活力单位。

蔗糖酶活力(μg/min/g 鲜重)=[1000×(ΔA+0.12)÷0.0648×V1]÷(W×V1÷V2)÷T=1543×(ΔA +0.12)÷W。

1000：1mg/mL=1000μg/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。