

组织及血液蔗糖酶活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHB4-M48	组织及血液蔗糖酶试剂盒	48T	微量法

产品说明：

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。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。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体2 mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	粉剂×1支	4℃保存
试剂三	液体4 mL×1 瓶	常温保存
标准品	粉剂×1支	4℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：用时加入 1 mL 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂 4℃保存一周；
- 2、标准品：用时加入 1 mL 蒸馏水充分溶解，制备 10 mg/mL 葡萄糖标准溶液待用；用不完的试剂4℃保存一周。

操作步骤：

一、样本处理

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。

二、测定步骤

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

2、标准品的制备：

将标准品用蒸馏水稀释至2.5、2、1.5、1、0.8、0.6、0.4、0.2、0mg/mL（0mg/mL为空白管）。

3、加样表（在EP管中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	标准管
试剂一	15	15	15
蒸馏水	15		

样本	30	30	
标准品			30
试剂二		15	15
置于25℃准确水浴 10min			
试剂三	30	30	30
混匀, 100℃水浴 10min 左右(盖紧, 防止水分散失), 冷却至室温			
蒸馏水	210	210	210

混匀, 取200 μ L 至微量玻璃比色皿或96 孔板中测定各管540nm 吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。(每个测定管需设一个对照管)

三、蔗糖酶活力计算

1、标准曲线的建立:

以标准品的浓度为x 轴, 540nm 下的吸光度($\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$)为y 轴, 绘制标准曲线。根据标准曲线, 将 ΔA (y) 带入公式中计算出 x 值 (mg/mL)。

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。

$$\text{蔗糖酶活力(U/mg prot)} = (1000 \times x \times V1) \div (V1 \times Cpr) \div T = 100 \times x \div Cpr$$

2、按照样本质量计算:

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。

$$\text{蔗糖酶活力(U/g 质量)} = (1000 \times x \times V1) \div (W \div V2 \times V1) \div T = 100 \times x \div W$$

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: 样本质量, g。

注意事项:

当A 大于 1.2 时, 建议将样本用提取液稀释后进行测定。