

植物蔗糖酶活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: AC10092

规格: 100T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 2 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 支	4°C保存
试剂三	液体 4 mL×1 瓶	常温保存
标准品	粉剂×1 支	4°C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°C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°C保存一周。

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。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

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°C 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°C准确水浴 10min			
试剂三	30	30	30
混匀, 100°C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 200μL 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)。

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。

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

3、按照样本质量计算:

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。

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

1000: 1mg/mL=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。

参考文献:

[1] Karley A J, Ashford D A, Minto L M, et al. The significance of gut sucrase activity for osmoregulation in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*[J]. *Journal of insect physiology*, 2005, 51(12): 1313-1319.