



二糖酶测试盒说明书(精简版)

(货号: A082-2-1 测蔗糖酶)

一、测定原理:

蔗糖酶(Sucrase)作用于相应的底物产生单糖,该单糖在其氧化酶的作用下产生过氧化氢,过氧化氢同显色剂结合产生红色的产物,用分光光度计测定其光密度值,从而测定出蔗糖酶的活性。

二、试剂的组成和配制(25T~100T):

试剂一: 粉剂×2瓶, 稀释液 5mL×2瓶, 无色透明液体; 2~8℃保存。

底物的配制: 在试剂一粉剂中加入 5mL 的稀释液, 充分溶解后, 备用; 2~8℃保存。

试剂二: 终止剂 5mL×1瓶, 2~8℃保存。

试剂三: 50mL 液体×1瓶, 2~8℃保存。

葡萄糖标准液: 5.55mmol/L, 液体, 2~8℃保存。用时按体积比 1:2 的比例加蒸馏水稀释成 1.85mmol/L 葡萄糖标准液。

三、所需仪器及试剂:

可调 505nm 波长的可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿, 涡旋混匀器, 离心机, 37℃水浴锅, 秒表, 蒸馏水, 生理盐水, 氯仿(高脂样本会用到), 蛋白测定试剂(组织或细胞样本用, 本公司有售)。

四、操作表:

1、样本处理:

①、**液体样本:** 直接测定, 如超过线性范围用生理盐水稀释后测定。

②、**组织样本:** 准确称取组织重量,按重量(g): 体积(mL)=1: 9 的比例, 加入 9 倍体积的匀浆介质, 冰水浴条件下机械匀浆,2500 转/分,离心 10 分钟, 取上清液待测。[注]:匀浆介质可用磷酸盐缓冲液(0.1mol/L pH 7.4)或生理盐水(0.9%);

③、**细胞样本:**

A、细胞收集:将制备好的细胞悬液取出, 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀; 用等渗缓冲液(推荐 0.1mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液)清洗 1~2 次, 同样 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀;

B、细胞破碎:加入 0.2~0.3mL 的匀浆介质(推荐 0.1mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液或生理盐水)进行匀浆, 冰水浴条件下超声破碎(功率:300W,3~5 秒/次,间隔 30 秒, 重复 3~5 次)或手动匀浆, 制备好的匀浆液不离心直接测定。也可采用裂解液裂解(推荐 TritonX-100, 1~2%,裂解 30~40 分钟),裂解好的液体不离心直接测定。[注]:建议细胞密度在 100 万个/mL 以上。破碎好的液体可显微镜观察细胞是否破碎完全。

2、酶促反应:(可用离心管操作)

	测定管	对照管
样本(μL)	25	
底物(μL)	50	50
混匀, 37℃孵育 20 分钟		
终止剂(μL)	25	25
样本(μL)		25
混匀, 4000 转/分钟离心 10 分钟, 取上清液显色		

3、显色反应:(第一种)(酶标仪比色)(100T)

	空白孔	标准孔	测定孔	对照孔
蒸馏水(μL)	8			
1.85mmol/L 葡萄糖标准液(μL)		8		
上清液(μL)			8	8
试剂三	200	200	200	200
轻轻震荡孔板, 37℃孵育 15 分钟,505nm 处, 酶标仪读数				

显色反应:(第二种)(分光光度计比色)(25T)

	空白管	标准管	测定管	对照管
蒸馏水(μL)	40			
1.85mmol/L 葡萄糖标准液(μL)		40		
上清液(μL)			40	40
试剂三	1000	1000	1000	1000
混匀, 37℃孵育 15 分钟,505nm 处, 蒸馏水调零, 分光光度计比色				

[注]:在做正式实验前, 先要取个别样本(可以挑选正常组一个和模型组一个)进行浓度梯度预试(稀释倍数可选 5 倍、10 倍、20 倍或其它), 以确定最佳取样浓度(最佳浓度时, 测定 OD-对照 OD 接近标准 OD 即可; 当然, 样本本身酶活力偏低时, 直接原液测定甚至可以加大酶促反应取样量或延长酶促反应时间)。

五、计算公式:

1、液体样本计算:

单位定义: 在 37℃ PH6.0 的条件下, 每毫升样本每分钟水解 1nmol 蔗糖定义为 1 个酶活力单位。

计算公式:

$$\text{乳糖酶活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{反应}} \div T \times \frac{10^6}{V_{\text{样}}}$$

C_{标准}: 标准品浓度, 1.85mmol/L;

V_{反应}: 酶促反应总体积, 0.1×10⁻³L;

V_样: 取样量, 0.025mL;

T: 酶促反应时间, 20 分钟;

10⁶: mmol→nmol 的转化。

2、组织(或细胞)样本计算:

单位定义: 在 37℃ PH6.0 的条件下, 每毫克蛋白组织每分钟水解 1nmol 蔗糖定义为 1 个酶活力单位。

计算公式:

$$\text{乳糖酶活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{反应}} \div T \times \frac{10^6}{C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}}$$

C_{标准}: 标准品浓度, 1.85mmol/L;

V_{反应}: 酶促反应总体积, 0.1×10⁻³L;

V_样: 取样量, 0.025mL;

T: 酶促反应时间, 20 分钟;

C_{pr}: 样本蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白);

10⁶: mmol→nmol 的转化。