

蔗糖酶 (Acid Invertase, AI) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-DF021 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

一、产品简介:

蔗糖酶即蔗糖转化酶 (Invertase, E.C.3.2.1.26) 在蔗糖代谢中催化蔗糖分解为果糖和葡萄糖, 是蔗糖代谢关键酶之一。

根据最适 PH 值, 蔗糖转化酶分为酸性转化酶 (AI) 和中性转化酶 (NI) 两种类型, 许多报道均将中性转化酶同碱性转化酶看作一种转化酶。

AI 的最适 pH 为 3.0 ~ 5.0, 动物来源的蔗糖酶在酸性环境中活性较高, 因此以测酸性转化酶为主。

AI 催化蔗糖降解产生还原糖, 进一步与 3,5-二硝基水杨酸反应, 生成棕红色氨基化合物, 经光谱扫描在 540nm 有特征光吸收, 在一定范围内 540nm 光吸收增加速率与 AI 活性成正比。

二、试剂盒的组成和配制:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|-------------|----------|--|
| 提取液 | 液体 30mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂一 | 液体 30mL×1 瓶 | 4°C 避光保存 | |
| 试剂二 | 粉剂 1 瓶 | 4°C 保存 | 1. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 7.5mL 试剂一充分溶解备用; 3. 用不完的试剂 4°C 保存。 |
| 试剂三 | 液体 13mL×1 瓶 | 4°C 避光保存 | |
| 标准品 | 粉体 1 支 | 4°C 保存 | 1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。 |

三、所需的仪器和用品:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

称样本 0.1g (水分充足的样本可取 0.5g) 于研钵中, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆后转入离心管中。12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注意】 若样本含糖量高, 可引起 A 对照值较大如超过 1.6, 即检测背景值过高会影响检测, 可在样本制备过程中增加除糖步骤: 取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 经预冷的 95% 乙醇冰浴匀浆, 4°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C 离心 5min; 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入经预冷的 80% 乙醇混匀, 4°C 放置 5min; 12000rpm, 4°C 离心 5min; 弃上清, 留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液涡旋混匀, 4°C 放置 10min; 12000rpm, 4°C 离心 10min; 留上清, 弃沉淀。上清液置冰上待测。

2、上机检测:

- ① 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。
- ② 在 EP 管中依次加入:

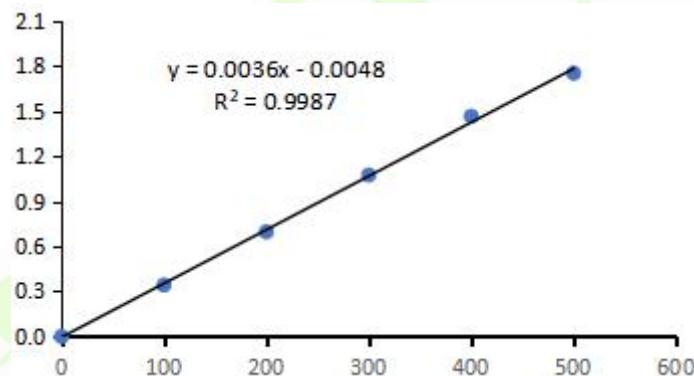
| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|-----------|-----|-----|
|-----------|-----|-----|

| | | |
|--|-----|-----|
| 样本 | 100 | 100 |
| 试剂一 | 250 | 500 |
| 试剂二 | 250 | |
| 混匀, 37°C准确水浴 20min 后, 95°C水浴 10min (用封口膜缠紧, 以防止水分散失), 流水冷却后充分混匀 (以保证浓度不变) | | |
| 试剂三 | 250 | 250 |
| 混匀, 95°C水浴 10min (用封口膜缠紧, 以防止水分散失), 流水冷却后充分混匀, 全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中, 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个测定管需设一个对照管)。 | | |

- 【注】：1. 若吸光值大于 1.5, 可以用蒸馏水稀释样本后测定, 计算公式中乘以相应稀释倍数 D。
2. 若 ΔA 值在零附近徘徊, 可增加样本加样体积 V1 (如增至 200 μL , 则试剂一相应减少), 或延长 37°C 水浴时间 (如增至 40min 或更长), 则相应的 V1 和 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 0.0036x - 0.0048$; x 为标准品质量 (μg), y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

单位定义: 37°C每毫克蛋白每分钟产生 1 μg 还原糖定义为一个酶活性单位。
 $\text{蔗糖酶(AI)} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0036] \div (V1 \times Cpr) \div T \times D$
 $= 138.9 \times (\Delta A + 0.0048) \div Cpr \times D$

3、按鲜重计算：

单位定义: 37°C每克组织每分钟产生 1 μg 还原糖定义为一个酶活性单位。
 $\text{蔗糖酶(AI)} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0036] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$
 $= 138.9 \times (\Delta A + 0.0048) \div W \times D$

V---加入提取液体积, 1mL; V1---加入反应体系中样本体积, 0.1mL;

T---反应时间, 20min; W---样本鲜重, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20°C 保存), 标准品母液浓度为 5mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 1, 2, 3, 4, 5. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

| | | | | | | |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标品浓度 μg/mL | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 标品稀释液 uL | 0 | 40 | 80 | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL | 200 | 160 | 120 | 80 | 40 | 0 |

各标准管混匀待用。

3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

| 试剂名称 (μL) | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|-----------|-----|--------------|
| 标品 | 100 | |
| 蒸馏水 | | 100 |
| 试剂一 | 500 | 500 |
| 试剂三 | 250 | 250 |

混匀，95℃水浴 10min，冷却后，全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中，540nm 下测定， $\Delta A = A - 0$ 浓度管。