

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K751-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(500-520 nm)

Elabscience®蔗糖酶比色法测试盒

Sucrase Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织样本中蔗糖酶的活力。

检测原理

蔗糖酶作用于其底物(蔗糖)生成葡萄糖,葡萄糖在葡萄糖氧化酶的作用下产生过氧化氢,过氧化氢同显色剂反应产生红色产物,在 505 nm 波长处有强烈吸收峰。在一定浓度范围内,其吸光度与葡萄糖浓度呈线性关系。因此,通过测定 505 nm 处吸光度,可计算葡萄糖生成量,进而计算出蔗糖酶活力。

本试剂盒检测组织样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	底物 (Substrate)	粉剂×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酚溶液 (Phenol Solution)	12 mL×1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶溶液 (Enzyme Solution)	12 mL×1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	终止剂 (Stop Solution)	粉剂×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	50 mmol/L 葡萄糖标准品 (50 mmol/L Glucose Standard)	1 mL×1 支	2-8°C 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明:试剂严格按上表中的保存条件保存,不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂,使用前请先离心,以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(500-520 nm，最佳检测波长为 505 nm)。

试剂准备

① 检测前，将试剂平衡至室温。

② 试剂一工作液配制：

取8 mL试剂二加入试剂一瓶中，震荡至试剂一全部溶解均匀，未使用完的试剂可在2-8℃保存7天。

③ 试剂五工作液配制：

取5 mL超纯水加入试剂五中，震荡至试剂五全部溶解均匀，未使用完的试剂可在2-8℃保存7天。

④ 显色液配制：

将试剂三与试剂四按照1:1 比例混合均匀，按需配制，现配现用。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	0	1	2	5	10	15	20	25
50 mmol/L 标准品(μL)	0	10	20	50	100	150	200	250
双蒸水(μL)	500	490	480	450	400	350	300	250

样本准备

① 样本处理

组织样本:取 0.05-1.00 g 新鲜组织块,用 2-8 ℃ 的 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4) 漂洗,去除血液,滤纸吸干,称重,放入匀浆容器中,按照重量(g): 体积(mL)= 1: 4 的比例加入 2-8 ℃ 的 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4) 匀浆。4 ℃ 下 10000 ×g 离心 10 min, 取上清液置于冰上待测。若不能当天检测, 组织样本置于-80 ℃ 环境下可保存一个月。

② 样本的稀释

在正式检测前, 需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 20-2000 U/mL, 请参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
20%大鼠回肠匀浆	不稀释	20%大鼠肝匀浆	不稀释
20%大鼠胃匀浆	不稀释		

注: 稀释液为 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)。

实验关键点

- ① 注意控制酶促反应的时间。
- ② 配制显色液时避免污染试剂四。

操作步骤

- ① 标准管：取 25 μL 不同浓度标准品，分别加入到 1.5 mL 的 EP 管中。
测定管：取 25 μL 待测样本，加入到 1.5 mL 的 EP 管中。
对照管：取 50 μL 试剂一工作液，加入到 1.5 mL 的 EP 管中。
- ② 向步骤①的标准管和测定管中加入 50 μL 试剂一工作液。
- ③ 混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。
- ④ 向步骤③的各管中加入 25 μL 试剂五工作液，混匀。
- ⑤ 向步骤④对照管中加入 25 μL 待测样本。
- ⑥ 混匀，1780 $\times g$ 离心 10 min，管分别取 8 μL 上清液，加入到酶标板各对应孔中。
- ⑦ 向步骤⑥各孔中加入 200 μL 显色液。
- ⑧ 酶标仪上振板 10 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min，酶标仪 505 nm 测定各孔 OD 值。

操作表

	标准管	测定管	对照管
不同浓度的标准品(μL)	25	--	--
待测样本(μL)	--	25	--
试剂一工作液(μL)	50	50	50
混匀, 37 °C 孵育 20 min			
试剂五工作液(μL)	25	25	25
待测样本(μL)	--	--	25
混匀, 1780 \times g 离心 10 min, 取上清液加入酶标板			
上清液(μL)	8	8	8
显色液(μL)	200	200	200
酶标仪上振板 10 s, 37 °C 孵育 15 min, 酶标仪 505 nm 测定各孔 OD 值。			

本试剂盒检测组织样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

定义: 37℃ 条件下, 每毫克组织蛋白每分钟水解 1 nmol 蔗糖的酶量为一个活力单位。

$$\text{蔗糖酶活力 (U/mgprot)} = \frac{\Delta A - b}{a} \div T \times 1000^* \times f \div C_{pr}$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA : 样本的绝对 OD 值(测定孔 OD 值-对照孔 OD 值)

T: 酶促反应时间(20 min)

C_{pr} : 样本加入检测体系时的蛋白浓度(mgprot/mL)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

1000*: 单位换算 $1 \mu\text{mol} = 1000 \text{ nmol}$

附录1 关键数据

1. 技术参数

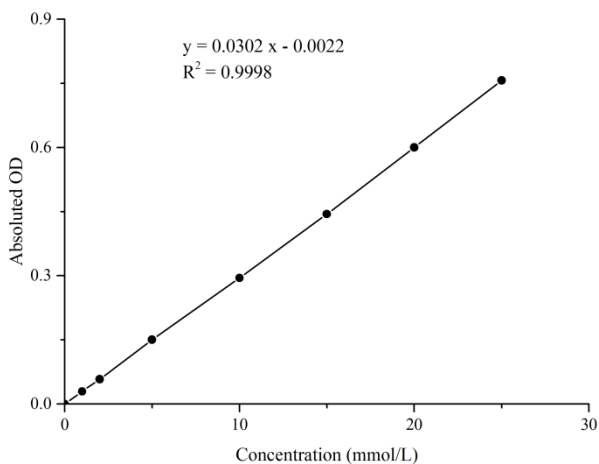
检测范围	20-2000 U/mL	平均批间差	6.5 %
灵敏度	20 U/mL	平均批内差	5.4 %
平均回收率	100 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①标准品浓度测定数据(数据仅供参考):

标准品浓度 (mmol/L)	0	1	2	5	10	15	20	25
OD 值	0.081	0.112	0.139	0.234	0.366	0.511	0.680	0.868
	0.085	0.113	0.142	0.231	0.389	0.543	0.686	0.811
平均 OD 值	0.083	0.112	0.140	0.233	0.378	0.527	0.683	0.840
绝对 OD 值	0.000	0.030	0.058	0.150	0.295	0.444	0.600	0.757

②按上表数据绘制标准曲线，如下图所示：



附录2 实例分析

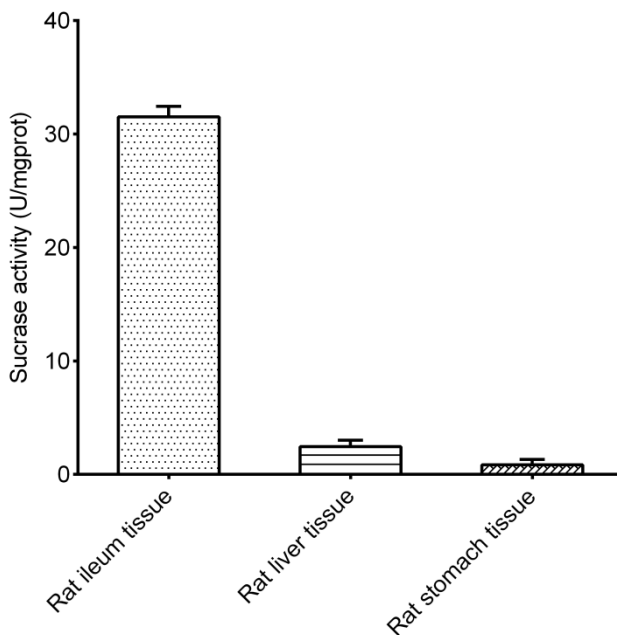
例如检测大鼠小肠组织(数据仅供参考):

取25 μL 20%大鼠回肠匀浆, 按操作表进行检测, 其结果如下:

标准曲线: $y = 0.0306x + 0.0025$, 测定孔平均OD值为0.204, 对照孔平均OD值为0.079, 同时测得20%大鼠回肠组织匀浆中蛋白浓度为6.48 mgprot/mL, 蔗糖酶计算结果为:

$$\text{蔗糖酶活力 (U/mgprot)} = \frac{0.204 - 0.079 - 0.0025}{0.0306} \div 20 \times 1000 \div 6.48 = 30.89 \text{ U/mgprot}$$

按照说明书, 测定大鼠回肠组织(20%组织匀浆, 蛋白含量6.48 mgprot/mL, 加样量25 μL)、大鼠肝组织(20%组织匀浆, 蛋白含量23.65 mgprot/mL, 加样量25 μL)和大鼠胃组织(20%匀浆, 蛋白浓度为5.89 mgprot/mL, 加样量25 μL)蔗糖酶活性(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本酶活力太低	减少匀浆介质比例重新制作样本测定
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
	孵育温度或时间不恰当	在 37℃ 条件下孵育，可适当延长酶促反应时间
复孔差异大	加样时间过长，酶促反应时间差异大	尽量减少平行样间的加样时间间隔
	显色的上清液中混有沉淀	增加离心时间并在取上清液时注意不要将移液器枪头过多深入液面以下

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. Nano Today. IF:18.962
2. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. Metabolism Open, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
3. Zhang Y, Wang Z, Shi B, et al. Effect of gingival mesenchymal stem cell-derived exosomes on inflammatory macrophages in a high-lipid microenvironment[J]. International Immunopharmacology, 2021, 94(9499):107455. IF:4.932
4. Alsayyah A, ElMazoudy R, Al-Namshan M, et al. Chronic neurodegeneration by aflatoxin B1 depends on alterations of brain enzyme activity and immunoexpression of astrocyte in male rats[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2019, 182: 109407. IF:4.527
5. Faheem M. Synthesis and Biological Evaluation of Benzimidazole Derivatives as Potential Neuroprotective Agents in an Ethanol-Induced Rodent Model[J]. ACS Chemical Neuroscience, 2021, 12(3):489–505. IF:4.418
6. Ren F , Xu X , Xu J B , et al. Compound essential oils relieve oxidative stress caused by PM 2. 5 exposure by inhibiting autophagy through the AMPK / mTOR pathway[J]. Environmental Toxicology, 2021 Sep; 36(9):1765-1774. IF:4.119
7. Mohsin Alvi A, Tariq Al Kury L, Umar Ijaz M, et al. Post-Treatment of Synthetic Polyphenolic 1, 3, 4 Oxadiazole Compound A3, Attenuated Ischemic Stroke-Induced Neuroinflammation and Neurodegeneration[J]. Biomolecules, 2020, 10(6): 816. IF:4.082
8. Darband S G, Sadighparvar S, Yousefi B, et al. Quercetin attenuated oxidative DNA damage through NRF2 signaling pathway in rats with DMH induced colon carcinogenesis[J]. Life sciences, 2020(253-). IF:3.708
9. Shah F A, Ali T, Khan A U. Potent Natural Antioxidant Carveol Attenuates MCAO-induced Oxidative stress, Neurodegeneration by Regulating the Nrf-2 pathway[J]. Frontiers in Neuroscience, 2020, 14: 659. IF:3.707
10. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2 diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. Gene, 2020, 768(7):145288. IF:3.688

