

蔗糖磷酸化酶 (Sucrose Phosphorylase, SP) 试剂盒说明书 (分光法 48 样)

一、产品简介：

蔗糖磷酸化酶(EC2.4.1.7)主要存在于微生物和植物中，是一种葡萄糖基转移酶，催化葡萄糖基转移到果糖、木糖、半乳糖和鼠李糖等，合成相应的葡萄糖基低聚糖。在食品，化妆品，医药行业具有广泛的应用。

本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法：蔗糖磷酸化酶以磷酸为受体，催化蔗糖产生 1-磷酸葡萄糖，在相应酶混合物的作用下使 NADP⁺还原成 NADPH，进而与特异的显色剂反应，产生在 450nm 有最大吸收峰的黄色物质，可算出蔗糖磷酸化酶 (SP) 的活性大小。

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 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	临用前加 1.8mL 蒸馏水溶解，仍-20℃ 保存
试剂三	液体 23μL×1 支	-20℃ 保存	临用前加 1.8mL 蒸馏水溶解，仍-20℃ 保存
试剂四	液体 1.8mL×1 支	4℃ 保存	
试剂五	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前加 8.3mL 蒸馏水溶解，仍 4℃ 保存
标准品	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、可调式移液器、天平、低温离心机、研钵、冰、蒸馏水。

四、蔗糖磷酸化酶 (SP) 活性测定：

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：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清液置于冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量 (g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取

② 细菌/真菌样本：

取约 500 万个细胞，加入 1mL 提取液，冰浴超声破碎细胞（功率 300w，超声 3S，间隔 5S，总时间 3min）；12000rpm，4℃离心 10min，取上清液置于冰上待测

【注】：若增加样本量，按照细胞数量 (10⁴ 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例进行提取

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂在检测前解冻至常温 (25℃) 状态。

③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

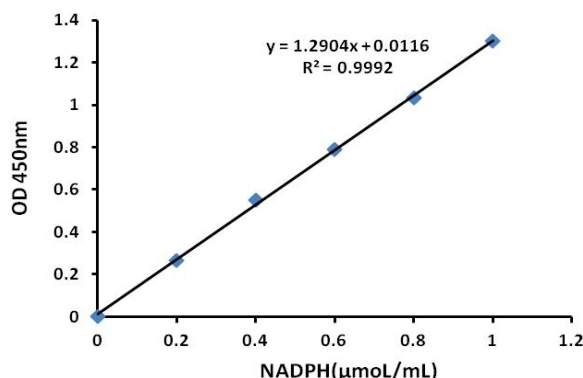
试剂名称 (μL)	测定管
样本	35
试剂一	385
试剂二	35
试剂三	35
试剂四	35
试剂五	175

室温（25℃）下反应，混匀后，立即于 450nm 处读取吸光值 A1，40S 后读取 A2。△A=A2-A1。

- 【注】：1 若△A 值在零附近，可以适当延长反应时间，每隔 20s 读取一次吸光值，选择吸光值呈线性增长的一段反应时间 T，重新确定的 T 需代入计算公式重新计算。**
- 2 若样本做特殊处理或本身含有高浓度的还原型物质（如维生素 C 等），需加设一个样本自身对照（对照加样顺序：35μL 样本+560μL 试剂一+35μL 试剂二+35μL 试剂三+35μL 试剂四）**

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 1.2904x + 0.0116$ ，x 是 NADPH 摩尔质量： $\mu\text{mol/mL}$ ，y 是 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算

单位定义：在 25℃ 条件下，每毫克蛋白质每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{SP 活性 (nmol/min / mg prot)} = [(\Delta A - 0.0116) \div 1.2904 \times V1 \times 10^3] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T$$

$$= 1162.4 \times (\Delta A - 0.0116) \div \text{Cpr}$$

3、按照样本质量计算

单位定义：在 25℃ 条件下，每克样本每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{SP 活性 (nmol/min / g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.0116) \div 1.2904 \times V1 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 1162.4 \times (\Delta A - 0.0116) \div W$$

4、按照细胞数量计算

单位定义：在 25℃ 条件下，每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{SP 活性 (nmol/min / } 10^4 \text{ cell)} = [(\Delta A - 0.0116) \div 1.2904 \times V1 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$= 2.32 \times (\Delta A - 0.0116)$$

V----加入提取液体积，1 mL； V1----反应体系中样本体积，0.035mL；

W----样本质量，g； T----反应时间，40s=2/3 min；

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

注意事项：

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1nmol/ μL ）：向标准品 EP 管里面加入 0.6mL 蒸馏水（母液需在两天内用且 -20℃ 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/ μL 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。