

蔗糖磷酸化酶 (Sucrose Phosphorylase, SP) 试剂盒说明书 (微板法 96 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 110mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	临用前加 1.1mL 蒸馏水溶解,仍-20℃保存
试剂三	液体 14μL×1 支	-20℃ 保存	临用前加 1.1mL 蒸馏水溶解,仍-20℃保存
试剂四	液体 1.1mL×1 支	4℃ 保存	
试剂五	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前加 5.3mL 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:

酶标仪、96 孔板、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,冰浴超声波破碎细胞 (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 酶标仪预热 30min,调节波长至 450nm。
- ② 所有试剂在检测前解冻至常温 (25℃) 状态。
- ③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	110
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	10
试剂五	50
室温 (25℃) 下反应,混匀后,立即于 450nm 处读取吸光值	

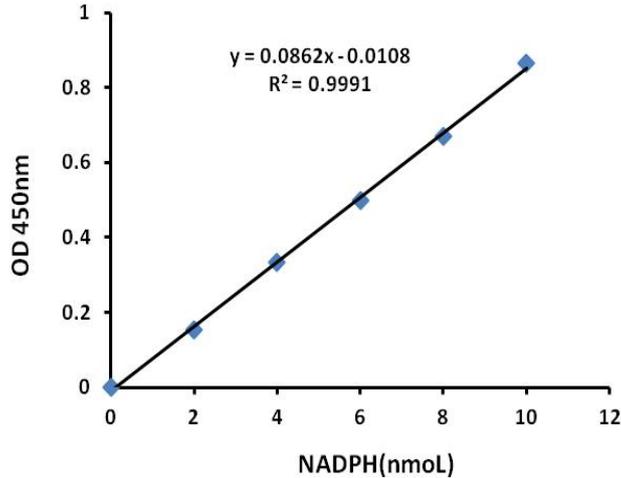
A1, 40S 后读取 A2。 $\Delta A = A2 - A1$ 。

【注】：1 若 ΔA 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：10 μ L 样本+160 μ L 试剂一+10 μ L 试剂二+10 μ L 试剂三+10 μ L 试剂四）

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0862x - 0.0108$ ，x 是 NADPH 摩尔质量：nmol,y 是 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算

单位定义：在 25 $^{\circ}$ C 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。

SP 活性 (nmol/min /mg prot) = $[(\Delta A + 0.0108) \div 0.0862] \div (Cpr \times V1) \div T = 1740 \times (\Delta A + 0.0108) \div Cpr$

3、按照样本质量计算

单位定义：在 25 $^{\circ}$ C 条件下，每克样本每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

SP 活性 (nmol/min /g 鲜重) = $[(\Delta A + 0.0108) \div 0.0862] \div (W \times V1 \div V) \div T = 1740 \times (\Delta A + 0.0108) \div W$

4、按照细胞数量计算

单位定义：在 25 $^{\circ}$ C 条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

SP 活性 (nmol/min/10⁴ cell) = $[(\Delta A + 0.0108) \div 0.0862] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 3.48 \times (\Delta A + 0.0108)$

V----加入提取液体积，1 mL； V1----反应体系中样本体积，0.01mL；

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/ μ L）：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 $^{\circ}$ C 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/ μ L。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。