

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

(货号: G0514W 微板法 96 样)

一、产品简介:

蔗糖磷酸化酶(EC2.4.1.7)主要存在微生物和植物中,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°C保存 | |
| 试剂一 | 液体 15mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂二 | 液体 μL×1 支 | -20°C保存 | 临用前甩几下使试剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解,可-20°C分装冻存。 |
| 试剂三 | 粉剂 mg×1 支 | -20°C保存 | 临用前甩几下使试剂落入底部,前加 1.1mL 蒸馏水溶解,可-20°C分装冻存。 |
| 试剂四 | 液体 1.1mL×1 支 | 4°C保存 | |
| 试剂五 | 粉剂 mg×1 瓶 | 4°C保存 | 临用前甩几下使试剂落入底部,再加 5.3mL 蒸馏水溶解,仍 4°C保存。 |
| 标准品 | 粉剂 mg×1 支 | -20°C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、水浴锅、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°C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°C离心 10min, 取上清液置冰上待测。

【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 试剂解冻至室温 (25°C), 或可放在 25°C 条件下水浴 15-30min。

③ 试剂一和二和三和四和五可按照 110:10:10:10:50 比例配成混合液 (一枪加 190μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。

④ 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂:

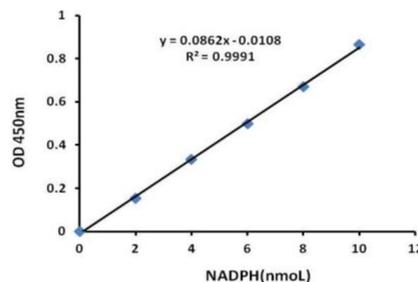
| 试剂名称 (μL) | 测定管 |
|---|-----|
| 样本 | 10 |
| 试剂一 | 110 |
| 试剂二 | 10 |
| 试剂三 | 10 |
| 试剂四 | 10 |
| 试剂五 | 50 |
| 室温 (25°C) 下反应, 混匀后, 立即于 450nm 处读取吸光值 A1, 40S 后读取 A2。ΔA=A2-A1。 | |

【注】: 1 若ΔA 小于 0.01, 可以适当延长反应时间 T, 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; 或增加样本加样体积 V1 (如增至 30μL, 则试剂一相应减少); 或增加取样质量 W; 则改变后的 T 和 V1 和 W 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: 10μL 样本+160μL 试剂一+10μL 试剂二+10μL 试剂三+10μL 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°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°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/真菌数量计算:

单位定义: 在 25°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; 500---细胞/真菌数量, 万;

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。

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°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/μL。
- 3 按照 10μL 的各个浓度标准品+110μL 试剂一+10μL 试剂四+70μL 蒸馏水, 混匀后孵育 5min 后于 450nm 处读值, 根据结果即可制作标准曲线。