

Sucrose Phosphorylase Activity Assay Kit

蔗糖磷酸化酶 (SP) 试剂盒说明书

货号: G0514F | 方法: 可见分光法 | 规格: 48 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 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 25mL×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 1.8mL 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,再加 1.8mL 蒸馏水溶解,可-20°C 分装冻存。
试剂四	液体 1.8mL×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 8.3mL 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:

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、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 (10^4 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 385:35:35:35:175 比例配成混合液（一枪加 665μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中按照下表依次加入试剂：

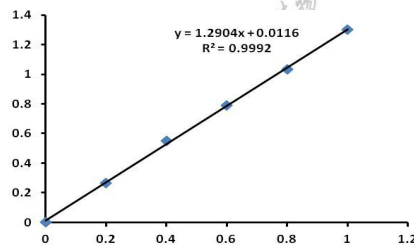
试剂名称 (μL)	测定管
样本	35
试剂一	385
试剂二	35
试剂三	35
试剂四	35
试剂五	175

室温 (25°C) 下反应，混匀后，立即于 450nm 处读取光值 A1，40S 后读取 A2。ΔA=A2-A1。

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

- 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。

$$\begin{aligned} \text{SP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0116) \div 1.2904 \times V1 \times 10^3] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 1162.4 \times (\Delta A - 0.0116) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

- 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。

$$\begin{aligned} \text{SP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0116) \div 1.2904 \times V1 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 1162.4 \times (\Delta A - 0.0116) \div W \end{aligned}$$

- 4、按照细胞/真菌数量计算：

单位定义：在 25°C 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。

$$\begin{aligned} \text{SP 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0116) \div 1.2904 \times V1 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 2.32 \times (\Delta A - 0.0116) \end{aligned}$$

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； 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。