

Sucrose Phosphorylase Activity Assay Kit

蔗糖磷酸化酶 (SP) 试剂盒说明书

货号: G0514W | 方法: 微板法 | 规格: 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 (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 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 190 μL 该混合

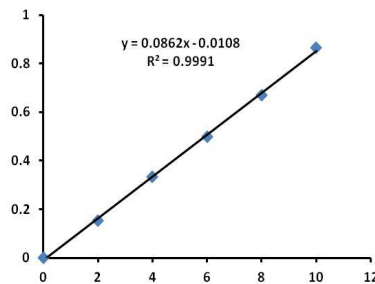
- 液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。
④ 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂:

| 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: $y = 0.0862x - 0.0108$, x 是 NADPH 摩尔质量: nmol, 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。

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

- 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。

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

- 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。

$$\text{SP 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0108) \div 0.0862] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 3.48 \times (\Delta A + 0.0108)$$

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。