

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

（货号：ADS-F-ZT009-48 分光法 48 样 有效期：6 个月）

### 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  $\text{NADP}^+$  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	液体1支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.8mL 蒸馏水溶解，可-20℃分装冻存。
试剂三	粉剂1支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使粉剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.8mL 蒸馏水溶解，可-20℃分装冻存。
试剂四	液体1.8mL×1支	4℃避光保存	
试剂五	粉剂1瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入9mL蒸馏水溶解，仍4℃保存。
标准品	粉剂1支	-20℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

### 三、所需的仪器和用品：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

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：

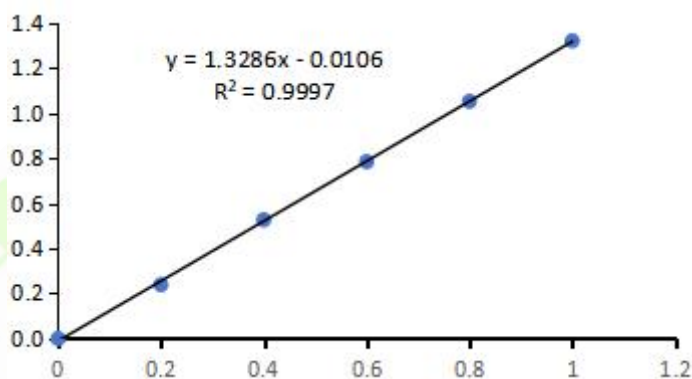
试剂名称（μL）	测定管
样本	35
试剂一	385
试剂二	35
试剂三	35
试剂四	35
试剂五	175
室温（25℃）下反应，混匀后，立即于 450nm 处读取吸光值 A1，40S 后读取 A2。ΔA=A2-A1。	

【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：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 = 1.3286x - 0.0106，x 是 NADPH 摩尔质量：μmol/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。

$$\begin{aligned} \text{SP 活性}(\text{nmol/min/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0106) \div 1.3286 \times V1 \times 10^3] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 1129 \times (\Delta A + 0.0106) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{SP 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0106) \div 1.3286 \times V1 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 1129 \times (\Delta A + 0.0106) \div W \end{aligned}$$

4、按照细胞/真菌数量计算：

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

$$\begin{aligned} \text{SP 活性}(\text{nmol/min/10}^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0106) \div 1.3286 \times V1 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 2.26 \times (\Delta A + 0.0106) \end{aligned}$$

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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 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），标准品母液浓度为 1nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/μL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 μg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	35	
蒸馏水		35
试剂一	385	385
试剂二	35	35
试剂三	35	35
试剂四	35	35
试剂五	175	175
25℃下反应，混匀后，立即于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		