

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 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1支	-20°C保存	1. 临用前 8000g 4°C 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°C 分装冻存。
试剂三	粉剂1支	4°C避光保存	1. 临用前 8000g 4°C 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°C 分装冻存。
试剂四	液体1.8mL×1支	4°C避光保存	
试剂五	粉剂1瓶	4°C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°C保存。
标准品	粉剂1支	-20°C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°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 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°C) 状态。

③ 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入：

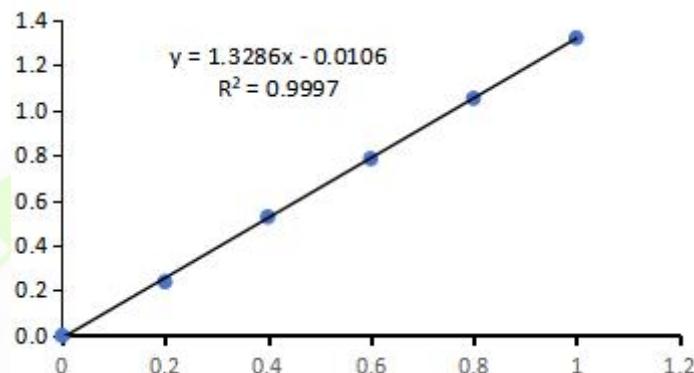
试剂名称 (μL)	测定管
样本	35
试剂一	385
试剂二	35
试剂三	35
试剂四	35
试剂五	175
室温 (25°C) 下反应, 混匀后, 立即于 450nm 处读取吸光值 A1, 40S 后读取 A2。ΔA=A2-A1。	

【注】：1 若ΔA 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°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。

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

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。

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

4、按照细胞/真菌数量计算：

单位定义：在 25°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。

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

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°C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°C下反应，混匀后，立即于 450nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A - A_{0 \text{ 浓度管}}$ 。		