

蔗糖磷酸化酶活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1532

产品规格：100管/96样

产品简介：

蔗糖磷酸化酶（Sucrose Phosphorylase, SP）(EC2.4.1.7)主要存在于微生物和植物中，属于糖基水解酶13家族，是一种催化转移葡萄糖苷键的酶，能够催化蔗糖和无机磷酸盐合成1-磷酸-葡萄糖。该酶主要以蔗糖、1-磷酸葡萄糖为供体，多类物质如多羟基的糖和糖醇、酚羟基、羧基等为受体，催化合成各种糖苷。

SP能够催化蔗糖产生1-磷酸葡萄糖，在葡萄糖磷酸变位酶催化下变位为6-磷酸葡萄糖，在6-磷酸葡萄糖脱氢酶作用下还原NADP+生成NADPH，导致340nm光吸收值增加。通过340nm吸光度的增加速率来反映SP活性。

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体110mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体7.5mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂三	液体1mL×1支	2-8℃
试剂四	粉剂×2支	-20℃
试剂五	粉剂×1瓶	-20℃
试剂六	粉剂×2支	-20℃
试剂七	粉剂×2支	-20℃

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入6mL蒸馏水，充分混匀。4℃可以保存4周。
2. 试剂四：临用前取1支加入0.6mL蒸馏水，充分混匀。分装后-20℃保存，避免反复冻融，可以保存2周；
3. 试剂五：粉剂置于瓶内玻璃管中。临用前加入10mL蒸馏水，充分混匀。-20℃分装保存，避免反复冻融，可以保存4周；
4. 试剂六：临用前取1支加入1mL蒸馏水，充分混匀（可做100T，为保证试剂盒使用时间，故多给一支）；可分装后-20℃保存，避免反复冻融，-20℃可以保存2周；临用前按试剂六：蒸馏水=1:1的比例稀释试剂六，现用现配；
5. 试剂七：临用前取1支加入0.7mL蒸馏水，充分混匀；可分装后-20℃保存，避免反复冻融，-20℃可以保存2周；临用前按试剂七：蒸馏水=1:1的比例稀释试剂七，现用现配。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、恒温培养箱/水浴锅、可调式移液器、研钵/匀浆器、微量石英比色皿/96孔UV板、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、 样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）：

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为1：5-10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液）进行冰浴匀浆，然后10000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
2. 细胞或细菌：先收集细胞或细菌到离心管内，离心后弃上清；按照细胞或细菌数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500-1000：1的比例（建议500万个细胞或细菌加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞或细菌（功率200W，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后10000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

待测。

3. 液体：直接检测。若液体浑浊可离心后取上清测定。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，分光光度计蒸馏水调零。

2. 试剂一 37°C 预热 10min。

3. 操作表：

试剂名称 (μL)	空白管	测定管
试剂一	85	65
试剂二	50	50
试剂三	5	5
试剂四	10	10
试剂五	10	10
试剂六	20	20
试剂七	20	20
混匀，37°C 水浴预热 5min		
样本	-	20
迅速吹打混匀，记录测定管第 15s 的吸光值 A1 测定 (A1 空白)，迅速置于 37°C 水浴或培养箱 2min (酶标仪有控温功能可将温度调至 37°C)，拿出迅速擦干测定 2min 15s 时的吸光值 A2 测定 (A2 空白)，计算 $\Delta A = (A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定}) - (A2 \text{ 空白} - A1 \text{ 空白})$ 。 空白管只需测定 1-2 次，如果样本数量过多也可以将试剂一到试剂七按上述比例混匀后进行测定。		

三、SP 活性计算：

1. 用微量石英比色皿测定的计算公式：

(1) 按照蛋白浓度计算

酶活定义：37°C，每毫克蛋白质每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{SP 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 803.85 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活定义：37°C，每克样本每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{SP 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 803.85 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活定义：37°C，每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{SP 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T \\ &= 803.85 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6220L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.0002L;

$V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL; W: 样本质量, g; C_{pr} : 蛋白浓度, mg/mL;

T: 反应时间, 2min; 10^9 : 1mol=10⁹nmol。

2. 用 96 孔板测定的计算公式：

将上述公式中的 d-1cm 修改为 d-0.6cm (96 孔板光径) 进行计算即可。

注意事项：

1. 如果测定吸光值 $A > 1$ ，建议用提取液稀释样本后再测定，计算公式中乘以稀释倍数；如果测定吸光值较低或接近空白 OD 值，建议增加样本量后再进行测定。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com