

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

（货号：BP10285W 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	液体 1 支	-20℃ 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 1.1mL 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° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解，可-20℃ 分装冻存。
试剂四	液体 1.1mL×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 5.3mL 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、实验器材：

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）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min，调节波长至 450nm。S
- ② 所有试剂在检测前解冻至常温（25℃）状态。在 96 孔板中依次加入：

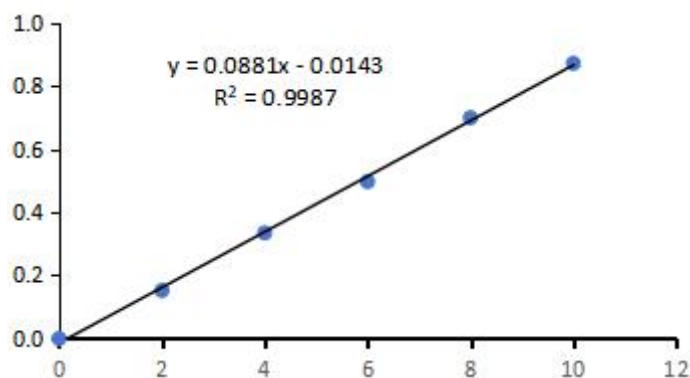
试剂组分（μL）	测定管
样本	10
试剂一	110
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	10
试剂五	50
室温（25℃）下反应，混匀后，立即于 450nm 处读取吸光值 A1，40S 后读取 A2。ΔA=A2-A1。	

【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：10μL 样本+160μL 试剂一+10μL 试剂二+10μL 试剂三+10μL 试剂四）

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 0.0881x - 0.0143，x 是 NADPH 摩尔质量：nmol,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。

SP 活性(nmol/min/mg prot)=[(ΔA+0.0143)÷0.0881]÷(Cpr×V1)÷T=1702.6×(ΔA+0.0143)÷Cpr

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。

SP 活性(nmol/min/g 鲜重)=[(ΔA+0.0143)÷0.0881]÷(W×V1÷V)÷T=1702.6×(ΔA+0.0143)÷W

4、按照细胞/真菌数量计算

单位定义：在 25℃条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

SP 活性(nmol/min/10⁴ cell)=[(ΔA+0.0143)÷0.0881]÷(500×V1÷V)÷T=3.41×(ΔA+0.0143)

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。

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 nmol/μL	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	10	
蒸馏水		10
试剂一	110	110
试剂二	10	10
试剂三	10	10
试剂四	10	10
试剂五	50	50
25℃下反应，混匀后，立即于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		