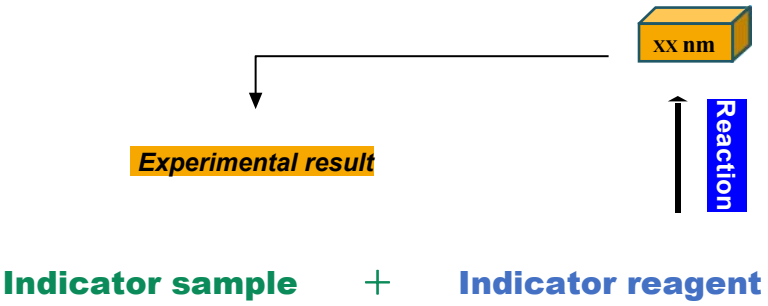
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0795　　规格：50管/48样

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

紫外分光光度法

注意：正式测定之前选择*2-3*个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

SP(EC2.4.1.7)主要存在于微生物和植物中，裂解葡萄糖苷键，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。此外，SP还能催化氢醌合成熊果苷，具有极强的美白效果，在化妆品工业中具有重要应用。

测定原理：

SP 能够以磷酸为受体，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。测定340nm吸光度增加速率，即可计算SP活性。

需自备的仪器和用品：

天平、低温离心机、恒温水浴锅、紫外分光光度计、1 mL 石英比色皿和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	-
缓冲液	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	液体 2mL×1 支	4℃保存	-
试剂三	液体 1mL×1 支	4℃保存	-
试剂四	粉剂 1 瓶	-20℃避光保存	临用前加 5mL 双蒸水溶解
试剂五	粉剂 1 瓶	-20℃避光保存	临用前加 5mL 双蒸水溶解
试剂六	粉剂 1 瓶	-20℃避光保存	临用前加 10mL 双蒸水溶解
试剂七	粉剂 1 瓶	-20℃避光保存	临用前加 10mL 双蒸水溶解

粗酶液提取

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，取上清待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10^4个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7秒，总时间 3min）；然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

测定操作表

	对照管	测定管
缓冲液（μL）	850	650
试剂一（μL）	500	500
试剂二（μL）	30	30
试剂三（μL）	20	20
试剂四（μL）	100	100
试剂五（μL）	100	100
试剂六（μL）	200	200
试剂七（μL）	200	200
混匀，37℃水浴预热 5min		
样本（μL）		200
迅速混匀，于 1mL 石英比色皿，对照管调零，测定 340nm 的初始值 A 1 ，测定完立即放入 37℃水浴准确反应 2min，迅速测定 340nm 吸光值 A 2 ，△A= A 2 - A 1 。		

SP 活性计算公式

1. 按照蛋白浓度计算

酶活定义：37℃，pH6.8 时，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）=△A÷（e×d）×V 反总÷V 样÷Cpr÷T=804×△A÷Cpr

2. 按照样本质量计算

酶活定义：37℃，pH6.8 时，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）=△A÷（e×d）×V 反总÷(V 样÷V 样总×W)÷T=804×△A÷W

3. 按照细胞数量计算

酶活定义：37℃，pH6.8 时，每10^4个细胞每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

SP 活性（nmol/min/10^4 cell）=△A÷（e×d）×V 反总÷(V 样÷V 样总×细胞数量（万个））÷T=804×△A÷细胞数量（万个）

e：NADPH 摩尔消光系数，6220 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 反总：反应体系总体积，2mL；V 样：反应体系中样本体积，0.2mL；W：样本质量，g；Cpr：蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，2min

注意事项

1. 粉剂-20℃保存，配制好的试剂 3 天内使用完。
2. 可选用 BCA 法测定蛋白含量试剂盒测定蛋白含量。