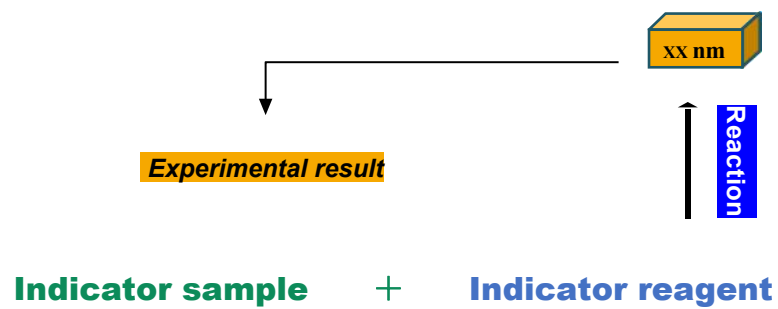


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

蔗糖磷酸化酶 (SP) 检测试剂盒说明书

微量法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

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。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、恒温水浴锅、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板 (UV板) 和蒸馏水。

试剂组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	—
缓冲液	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂二	液体 1.5mL×1 支	4℃保存	—
试剂三	液体 1mL×1 支	4℃保存。	—
试剂四	粉剂 1 支	-20℃避光保存	临用前加 1mL 双蒸水溶解
试剂五	粉剂 1 支	-20℃避光保存	临用前加 1mL 双蒸水溶解
试剂六	粉剂 1 支	-20℃避光保存	临用前加 2mL 双蒸水溶解
试剂七	粉剂 1 支	-20℃避光保存	临用前加 2mL 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（10⁴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：

1、分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长至340nm。

2、操作表

	对照管	测定管
缓冲液（μL）	85	65
试剂一（μL）	50	50
试剂二（μL）	3	3
试剂三（μL）	2	2
试剂四（μL）	10	10
试剂五（μL）	10	10
试剂六（μL）	20	20
试剂七（μL）	20	20
混匀，37℃水浴预热 5min		
样本（μL）		20

迅速混匀，于微量石英比色皿/96孔板（UV板），对照管调零，测定340nm的初始值A1，测定完立即放入37℃水浴准确反应2min，对照管调零，迅速测定340nm吸光值A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

SP 活性计算公式：

a. 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℃，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。

$$\text{SP 活性 (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div C_{\text{pr}} \div T = 804 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{SP 活性 (nmol/min/g)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 804 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活定义：37℃，pH6.8时，每10⁴个细胞每分钟催化产生1nmol NADPH为一个酶活单位。

$$\text{SP活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T = 804 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)}$$

ϵ ：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；C_{pr}：蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，2min

b. 用96孔板（UV板）测定的计算公式

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。

$$\text{SP 活性 (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div C_{\text{pr}} \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本质量计算

酶活定义：37°C，pH6.8时，每克样本每分钟催化产生1nmol NADPH为一个酶活单位。

$$\text{SP 活性 (nmol/min/g)} = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活定义：37°C，pH6.8时，每10⁴个细胞每分钟催化产生1nmol NADPH为一个酶活单位。

$$\text{SP活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T = 1608 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)}$$

ε : NADPH 摩尔消光系数, 6220 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 0.5cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2mL;

$V_{\text{样}}$: 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°C保存, 配制好的试剂 3 天内使用完。

2. 2. 可选用 BCA 法测定蛋白含量试剂盒测定蛋白含量。