

蔗糖磷酸化酶活性检测试剂盒说明书

Sucrose Phosphorylase Assay Kit

紫外分光光度法

货号: AK342

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES47	液体 60mL×1 瓶	4℃保存;
AK342-A	液体 20mL×1 瓶	4℃保存;
AK342-B	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加 15mL 双蒸水溶解, 4℃可保存一个月;
AK342-C	液体 2mL×1 支	4℃保存;
AK342-D	粉剂×2 瓶	-20℃保存, 临用取 1 瓶加 1.5mL 双蒸水溶解, 分装后-20℃可保存 2 周;
AK342-E	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存, 临用前加 10mL 双蒸水溶解, 分装后-20℃可保存 4 周;
AK342-F	粉剂×3 支	-20℃避光保存, 临用取 1 支加 1 mL 双蒸水溶解, 分装后-20℃可保存 2 周; 临用前按 AK342-F: 双蒸水=1:1 的比例稀释, 现用现配;
AK342-G	粉剂×4 支	-20℃避光保存, 临用取 1 支加 0.7 mL 双蒸水溶解, 分装后-20℃可保存 2 周; 临用前按 AK342-G: 双蒸水=1:1 的比例稀释, 现用现配。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 蔗糖磷酸化酶 (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。

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。

自备用品:

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

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, 取上清于冰上待测。
2. 细菌或细胞: 按照细菌或细胞数量 (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 200w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 10000g, 4℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
3. 液体: 直接检测; 若液体浑浊可离心后取上清测定。

测定步骤:

1. 紫外分光光度计预热 30min, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零;

- AK342-A 于 37℃预热 10min;
- 在石英比色皿/EP 管中按列表中顺序加入上述试剂:

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)
AK342-A	425	325
AK342-B	250	250
AK342-C	25	25
AK342-D	50	50
AK342-E	50	50
AK342-F	100	100
AK342-G	100	100
混匀, 37℃水浴预热5min		
样本待测液		100

迅速混匀, 于1mL 石英比色皿, 对照管调零, 测定第 15s 时340nm 的初始值A₁, 测定完立即放入 37℃水浴准确反应 2min, 再迅速测定 2min15s 时340nm 吸光值 A₂, $\Delta A = A_2 - A_1$

注意: 对照管只需测定 1-2 次。

SP 活性计算公式

- 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。

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

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

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

注: 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, 0.001L; V_样: 反应体系中样本体积, 0.1mL; V_{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; 10⁹: 1mol=10⁹nmol

注意事项:

- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴乳胶手套操作。
- 若吸光度过大或过小, 可以通过增加或减少样本量进行调整。
- 蛋白含量测定可选用 Bioss 提供的 BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#)) 。