

CheKine™ 蔗糖磷酸化酶（SP）活性检测试剂盒（微量法）

Cat #: KTB3120

Size: 48 T/24 S 96 T/48 S

	蔗糖磷酸化酶（SP）活性检测试剂盒（微量法）		
REF	货号：KTB3120	LOT	批号：见产品标签
	适用样本：植物组织、真菌		
	保质期：-20℃，避光保存 6 个月		

原理

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。CheKine™ 蔗糖磷酸化酶（SP）活性检测试剂盒（微量法）可检测植物组织、真菌样本。在该试剂盒中，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 340 nm 光吸收值增加。通过 340 nm 吸光度的增加速率来反映 SP 活性。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	60×2 mL	4℃
Assay Buffer	5 mL	10 mL	4℃
Reagent I	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存
Reagent II	0.25 mL	0.5 mL	4℃，避光保存
Reagent III	0.25 mL	0.5 mL	4℃，避光保存
Reagent IV	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存
Reagent V	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存
Reagent VI	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存
Reagent VII	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存

注意：正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。

自备耗材

- 酶标仪或紫外分光光度计（能测 340 nm 处的吸光度）
- 96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头、1.5 mL 离心管
- 水浴锅、低温离心机
- 去离子水
- 匀浆器或研钵（如果是组织样本）

试剂准备

- Extraction Buffer:** 即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
- Assay Buffer:** 即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
- Reagent I:** 临用前配制；48 T 加入 3.5 mL 去离子水，96 T 加入 7 mL 去离子水，充分溶解。用不完的试剂 4℃避光保存 2 周。
- Reagent II:** 即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。
- Reagent III:** 即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。
- Reagent IV:** 临用前配制；48 T 加入 0.7 mL 去离子水，96 T 加入 1.4 mL 去离子水，充分溶解。用不完的试剂-20℃避光分装保存 1 个月，避免反复冻融。
- Reagent V:** 临用前配制；48 T 加入 0.7 mL 去离子水，96 T 加入 1.4 mL 去离子水，充分溶解。用不完的试剂-20℃避光分装保存 1 个月，避免反复冻融。
- Reagent VI:** 临用前配制；48 T 加入 1.4 mL 去离子水，96 T 加入 2.8 mL 去离子水，充分溶解。用不完的试剂-20℃避光分装保存 2 周，避免反复冻融。
- Reagent VII:** 临用前配制；48 T 加入 1.4 mL 去离子水，96 T 加入 2.8 mL 去离子水，充分溶解。用不完的试剂-20℃避光分装保存 2 周，避免反复冻融。

样本制备

- 注意：**建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在-80℃下保存一个月。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 4 h 内完成样品解冻。
1. 植物组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆，10,000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
 2. 真菌：收集 500 万真菌到离心管内，用冷 PBS 清洗真菌，离心后弃上清，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴超声波破碎真菌 30 次（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s），然后 10,000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- 注意：**如需测定蛋白浓度，推荐使用 Abbkine 货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 340 nm，紫外分光光度计用去离子水调零。
2. 操作表（下述操作在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中操作）：

试剂	测定孔（μL）	对照孔（μL）
Assay Buffer	65	85
Reagent I	50	50
Reagent II	3	3
Reagent III	2	2
Reagent IV	10	10
Reagent V	10	10
Reagent VI	20	20



Reagent VII	20	20
混匀，37℃保温 5 min		
样本	20	0

3. 充分混匀，记录 340 nm 处 10 s 时吸光值 A_1 ，37℃反应 10 min 记录 130 s 时的吸光值 A_2 。测定孔记为 $A_{\text{测定}}$ ，对照孔记为 $A_{\text{对照}}$ 。
计算 $\Delta A = (A_{2\text{测定}} - A_{1\text{测定}}) - (A_{2\text{对照}} - A_{1\text{对照}})$ 。

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 ΔA 小于 0.05 可适当加大样本量。如果 A 大于 1 或 ΔA 大于 0.6，样本可用 Extraction Buffer 进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。若 ΔA 出现负值，则说明样本中不含 SP 或已降解。

结果计算

注意：我们为您提供的计算公式，包括推导过程计算公式和简洁计算公式。两者完全相等。建议以加粗的简洁计算公式为最终计算公式。

SP 活性的计算

A. 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算：

酶活单位定义：37℃，pH6.8 时，每毫克蛋白每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SP(U/mg\ prot) = [\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{样} \times Cpr) \div T = 1,608 \times \Delta A \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算：

酶活单位定义：37℃，pH6.8 时，每克样本每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SP(U/g\ 鲜重) = [\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div T = 1,608 \times \Delta A \div W$$

(3) 按真菌数量计算

酶活单位定义：37℃，pH6.8 时，每 10⁴ 真菌每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SP(U/10^4) = [\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (n \times V_{样} \div V_{样总}) \div T = 1,608 \times \Delta A \div n$$

$V_{反总}$ ：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10³ L/mol/cm； d ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； $V_{样}$ ：加入样本体积，0.02 mL； $V_{样总}$ ：加入提取液体积，1 mL； T ：反应时间，2 min； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g； n ：真菌数量，以万计。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d ：0.5 cm 调整为 d ：1 cm 进行计算即可。

结果展示

以下数据仅供参考，实验者需根据自己的实验对样品进行检测。

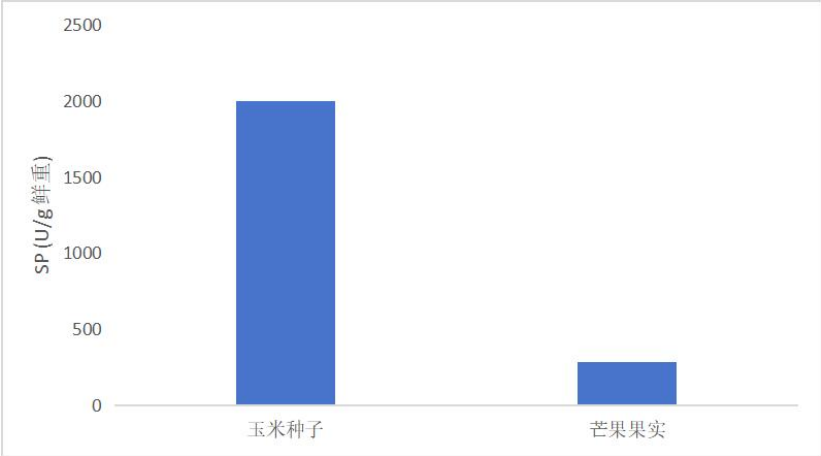


Figure 1. 本试剂盒测定玉米种子和芒果果实中 SP 的活性。



相关产品

Catalog No.	Product Name
KTB3110	CheKine™ 蔗糖合成酶（SS）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1560	CheKine™ 酰基转移酶（AAT）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1270	CheKine™ 丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测试剂盒（微量法）

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

