

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

微量法 100T/96S

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。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、恒温水浴锅、酶标仪、96 孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 15mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1 支，-20℃避光保存，临用前加 2.5mL 蒸馏水溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

试剂三：粉剂×1 支，-20℃避光保存，临用前加 5mL 蒸馏水溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

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：

1.酶标仪预热 30min，调节波长至 340nm。

2.操作表

试剂名称	对照管	测定管
试剂一（ μL ）	120	120
试剂二（ μL ）	20	20
试剂三（ μL ）	40	40

样本 (μL)		20
蒸馏水 (μL)	20	
迅速混匀，于 96 孔板，37°C 下测定 340nm 的初始吸光值与反应 2min 后的吸光值，测定管记作 A ₁ 与 A ₂ ，对照管记作 A ₃ 与 A ₄ ，ΔA = (A ₂ - A ₁) - (A ₄ - A ₃)。		

SP 活性计算公式：

1. 按照蛋白浓度计算

酶活定义：37°C，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。

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

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。

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

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。

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

ε：NADPH 摩尔消光系数，6220 L/mol/cm；d：比色皿光径，0.5cm；V 反总：反应体系总体积，0.2mL；V 样：反应体系中样本体积，0.02mL；W：样本质量，g；Cpr：蛋白浓度，mg/mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，2min

注意事项：

1. 可选用 BCA 法测定蛋白含量试剂盒测定蛋白含量。
2. 样本较多时，可以按照每个样本试剂一：试剂二：试剂三=120：20：40（μL）的比例配制工作液，用多少配多少，临用前立刻配制，10 分钟内使用。