

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、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/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。

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°C 水浴预热 5min		
样本 (μL)		20
迅速混匀, 于微量石英比色皿/96 孔板, 对照管调零, 测定 340nm 的初始值 A ₁ , 测定完立即放入 37°C 水浴准确反应 2min, 对照管调零, 迅速测定 340nm 吸光值 A ₂ , ΔA=A ₂ -A ₁ 。		

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°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。

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

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。

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

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。

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

A ÷ 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; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL; T: 反应时间, 2min

b. 用 96 孔板测定的计算公式

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。

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

3. 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。

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

ΔA ÷ 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, 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°C 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。