

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

分光光度法 50 管/48 样

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、1 mL 石英比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配制

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

缓冲液：液体 40mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 2mL×1 支，4℃ 保存。

试剂三：液体 1mL×1 支，4℃ 保存。

试剂四：粉剂 1 瓶，-20℃ 避光保存，临用前加 5mL 双蒸水溶解。

试剂五：粉剂 1 瓶，-20℃ 避光保存，临用前加 5mL 双蒸水溶解。

试剂六：粉剂 1 瓶，-20℃ 避光保存，临用前加 10mL 双蒸水溶解。

试剂七：粉剂 1 瓶，-20℃ 避光保存，临用前加 10mL 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

	对照管	测定管
缓冲液 (μL)	850	650
试剂一 (μL)	500	500
试剂二 (μL)	30	30
试剂三 (μL)	20	20
试剂四 (μL)	100	100
试剂五 (μL)	100	100
试剂六 (μL)	200	200
试剂七 (μL)	200	200
混匀，37℃ 水浴预热 5min		
样本 (μL)		200
迅速混匀，于 1mL 石英比色皿，对照管调零，测定 340nm 的初始值 A ₁ ，测定完立即放入		

37℃水浴准确反应 2min，迅速测定 340nm 吸光值 A_2 ， $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

SP 活性计算公式

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。

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

2. 按照样本质量计算

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

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

3. 按照细胞数量计算

酶活定义：37℃，pH6.8 时，每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

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

$A \div$ 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； $V_{\text{反总}}$ ：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℃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。