

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（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.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A1与A2，对照管记作A3与A4， $\Delta A = (A2 - A1) - (A4 - A3)$ 。

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。

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

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。

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

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。

$$\text{SP活性 (nmol/min/104 cell)} = \frac{\square}{\text{细胞数量 (万个)}} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T = 1608 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)}$$

\square ：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：

可选用BCA法测定蛋白含量试剂盒测定蛋白含量。

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。