

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

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

组成:

产品名称	AE017-50T/48S	Storage
提取液: 液体	50ml	4°C
试剂一: 液体	35ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	-20°C避光
试剂三: 粉剂	1 瓶	-20°C避光
说明书	一份	

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20°C避光保存, 临用前加 6ml 蒸馏水溶解; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。

试剂三: 粉剂×1 瓶, -20°C避光保存, 临用前加 12ml 蒸馏水溶解; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。

自备仪器和用品:

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。

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°C, 离心 10min, 取上清待测。

最终解释权所有 © 伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司, 保留一切权利



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。

测定步骤：

1. 分光光度计预热 30min，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2. 操作表

试剂名称	对照管	测定管
试剂一（ μl ）	600	600
试剂二（ μl ）	100	100
试剂三（ μl ）	200	200
样本（ μl ）		100
蒸馏水（ μl ）	100	

迅速混匀，于 1ml 石英比色皿，37℃ 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 ， $\Delta A = (A_2 - A_1) - (A_4 - A_3)$ 。

SP 活性计算公式：

1. 按照蛋白浓度计算

酶活定义：37℃，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。

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

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。

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

3. 按照细胞数量计算

酶活定义：37℃，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。

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

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，1ml； $V_{\text{样}}$ ：反应体系中样本体积，0.1ml；W：样本质量，g； C_{pr} ：蛋白浓度，mg/ml； $V_{\text{样总}}$ ：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=600：100：200（ 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。

