

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

微量法 100 管/96 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<sup>+</sup>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	AE018-100T/96S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 液体	15ml	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支, -20°C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°C保存, 禁止反复冻融。

试剂三: 粉剂×1支, -20°C避光保存, 临用前加 5ml 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、酶标仪、96孔板和蒸馏水。

### 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， $4^{\circ}\text{C}$ ，离心 10min，取上清置于冰上待测。

### 测定步骤：

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（ $\mu\text{l}$ ）	120	120
试剂二（ $\mu\text{l}$ ）	20	20
试剂三（ $\mu\text{l}$ ）	40	40
样本（ $\mu\text{l}$ ）		20
蒸馏水（ $\mu\text{l}$ ）	20	

迅速混匀，于 96 孔板， $37^{\circ}\text{C}$  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  $A_4$ ， $\Delta A = (A_2 - A_1) - (A_4 - A_3)$ 。

### SP 酶活性计算：

1. 按照蛋白浓度计算

**酶活定义：** $37^{\circ}\text{C}$ ，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：** $37^{\circ}\text{C}$ ，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：** $37^{\circ}\text{C}$ ，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。

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

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

### 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（ $\mu\text{l}$ ）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。

