



淀粉磷酸化酶活性检测试剂盒

SP Assay Kit

微量法

产品编号: AK427M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES427	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK427-A	20mL×1 瓶	4℃保存;
AK427-B	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 临用前加入1.5mL 水溶解, 剩余试剂分装后-20℃保存
AK427-C	粉剂×1 支	-20℃保存; 临用前加入1.5mL 水溶解, 剩余试剂分装后-20℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 淀粉磷酸化酶 (Starch Phosphorylase, SP) 是淀粉代谢过程唯一的可逆反应酶, 既可催化淀粉的合成, 也可催化淀粉的分解。

在高等植物中, 淀粉磷酸化酶 (合成方向) 主要存在于质体中, 负责延长淀粉的 α -1,4- 葡萄糖链的非还原末端; 淀粉磷酸化酶 (分解方向) 主要存在于细胞质基质中, 催化淀粉中的 α -1,4-糖苷键磷酸解产生葡萄糖-1-磷酸, 负责葡萄糖链的磷酸解, 是淀粉代谢过程中的关键酶。

在植物体中, 淀粉磷酸化酶分解方向的底物无机磷浓度比合成方向的底物葡萄糖-1-磷酸浓度几乎高了两个数量级, 一般认为淀粉磷酸化酶只催化淀粉的分解, 因此, 分解方向的淀粉磷酸化酶具有重要测定意义。

原理: 淀粉磷酸化酶催化淀粉中的 α -1,4-糖苷键与无机磷反应产生葡萄糖-1-磷酸, 葡萄糖-1-磷酸在磷酸葡萄糖变位酶的作用下产生葡萄糖-6-磷酸, 并在 6-磷酸葡萄糖脱氢酶催化下还原 NADP⁺产生 NADPH, 使 340nm 下吸光值增加。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板(UV 板)、研钵、冰和蒸馏水。

样本的前处理:

1. 组织: 按照组织质量 (g) : ES427 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL ES427) 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 (10^4 个) : ES427 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL ES427), 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. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零;
2. 工作液的配制: 临用前将 AK427-A、AK427-B、AK427-C 按照每个样本 170 μ L:10 μ L:10 μ L 的比例混合, 临用前配制, 半小时内使用。
3. 在 96 孔板中加入 10 μ L 样本和 190 μ L 工作液, 立即混匀, 记录 340nm 处 1min 时的吸光值 A1 和 6min 时的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

SP 活力单位的计算:

a. 使用微量比色皿测定:

1. 按照蛋白浓度计算

单位定义: 每 mg 组织蛋白每分钟产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SP (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V \text{ 反应} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times C_{pr}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{pr}$$

2. 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SP (U/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

3. 按样细胞数量计算

单位定义：每万个细胞每分钟产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SP (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.28 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：96 孔板光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液（ES427）体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细胞数量，500 万。

b.使用 96 孔板测定：

1. 按照蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SP (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T = 1286 \times \Delta A \div Cpr$$

2. 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SP (U/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

3. 按样细胞数量计算

单位定义：每万个细胞每分钟产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SP (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.572 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液（ES427）体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细胞数量，500 万。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))