



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：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、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（10⁴ 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. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm；
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：

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。

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

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。

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

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。

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

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](#))