

淀粉磷酸化酶（Starch phosphorylase, SP）试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：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：

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。

测定原理：

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。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 20mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 1.5mL 水溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存；

试剂三：粉剂×1 支，-20℃保存；临用前加入 1.5mL 水溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存。

样本的前处理：

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：临用前按照样本量将试剂一、试剂二、试剂三按照 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 活性计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算

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。

$$\text{SP (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T$$
$$= 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{SP (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 1286 \times \Delta A \div W$$

(2) 按样本鲜重计算

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。

$$\text{SP (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 2.572 \times \Delta A \div W$$

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。