

淀粉磷酸化酶活性测定说明书

(微板法 48 样)

一、产品简介:

淀粉磷酸化酶是植物组织中降解淀粉的关键酶之一,采用无机磷比色法测定淀粉磷酸化酶活性。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	提取液 70mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 mg×4 支	室温保存	临用前甩几下,使试剂落入底部,每支加 1.3mL 蒸馏水混合,煮沸至呈现透明溶解状态,待冷却后使用,室温保存即可。
试剂二	粉体 mg×2 支	-20°C保存	临用前甩几下,使试剂落入底部,每支再加 2.6mL 蒸馏水混合溶解,可-20°C分装冻存。
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 2mL×1 瓶	4°C保存	临用前加 1.8mL 的 B 液,再加 23.2mL 的蒸馏水,混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

【注】: 全程操作需无磷环境;试剂配置最好用新的枪头和玻璃移液器等,也可以用一次性塑料器皿,避免磷污染。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、淀粉磷酸化酶活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】: 若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 700nm
- ② 所有试剂解冻至室温(25°C),或于 25°C 水浴中孵育 15min 左右。在 EP 管中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管	对照管
提取液	120	120
试剂一	40	40
样本	100	
试剂二	40	40
混匀,37°C 孵育 20min		
试剂三	100	100
样本		100
混匀,12000rpm,4°C 离心 5min,上清液待测。		

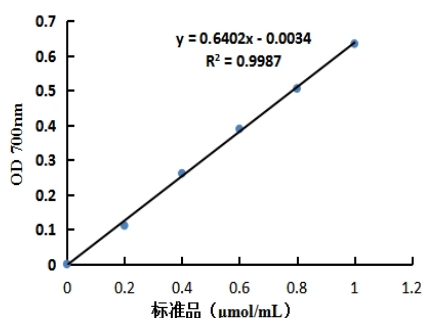
③ 显色反应:

上清液	50	50
试剂四	200	200
混匀, 室温静置 3min, 700nm 下读取各管吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【注】: 若 ΔA 小于 0.01, 则可增加样本加样体积 V1 (如由 100 μL 增至 200 μL , 则提取液相应减少); 若增加孵育时间 T (如由 20min 增至 60min); 或增加样本取样质量 W (如增至 0.2g)。则改变后的 V1 和 T 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.6402x - 0.0034$, x 是标准品摩尔浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算:

定义: 每小时每毫克组织蛋白分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 18.74 \times (\Delta A + 0.0034) \div Cpr \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6402 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 18.74 \times (\Delta A + 0.0034) \div W$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.1mL ;

V2---酶促反应总体积, 0.4mL;

T---反应时间, 1/3 小时;

W---样本鲜重, g;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (50 $\mu\text{mol/mL}$): 标准品用 1mL 提取液溶解。(母液需在两天内用)。
- 2 把母液用提取液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。