

淀粉磷酸化酶活性测定说明书

(货号: ADS-F-DF015-24 分光法 24 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 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 1 瓶	室温保存	临用前甩几下,使试剂落入底部,加 5.5mL 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 2 支	-20℃保存	临用前甩下使粉体落入底部,每支加 1.6mL 蒸馏水溶解,可-20℃分装冻存。
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 3mL×1 瓶	4℃保存	临用前加 2.9mL 的 B 液,再加 37.1mL 的蒸馏水,混匀溶解备用。需避光,现配现用,变蓝色不能使用。
标准品	粉体 1 支	4℃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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、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℃×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 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 700nm,蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温(25℃),或置于 25℃水浴中孵育 15min 左右。

③ 在 EP 管中依次加

入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
提取液	270	270
试剂一	80	80
样本	150	
试剂二	50	50
混匀, 37℃孵育 20min		
试剂三	200	200
样本		150
混匀, 12000rpm, 4℃离心 5min, 上清液待测		

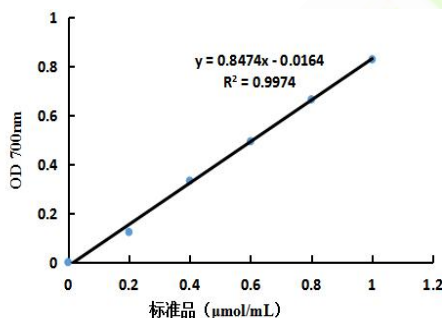
③ 显色反应：

上清液	150	150
试剂四	600	600
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 V_1 （如由 150 μL 减至 250 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 V_1 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： $y = 0.8474x - 0.0164$ ， 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。

酶活力($\mu\text{mol/h/mg prot}$)= $[(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V_2] \div (V_1 \times C_{pr}) \div T = 17.7 \times (\Delta A + 0.0164) \div C_{pr}$

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。

酶活力($\mu\text{mol/h/g 鲜重}$)= $[(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T$
 $= 17.7 \times (\Delta A + 0.0164) \div W$

V ---加入提取液体积，1mL；

V_1 ---加入样本体积，0.15mL；

V_2 ---酶促反应总体积，0.75mL；

T ---反应时间，1/3 小时；

W ---样本鲜重，g；

C_{pr} ---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。