

淀粉磷酸化酶活性测定说明书

(货号: G0570F 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°C保存	
试剂一	粉体 mg×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 mg×2 支	-20°C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°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 3mL×1 瓶	4°C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。
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:

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°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 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°C), 或置于 25°C 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°C孵育 20min		
试剂三	200	200
样本		150
混匀, 12000rpm, 4°C离心 5min, 上清液待测		

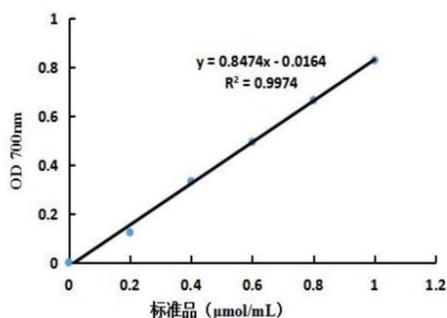
③ 显色反应:

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。