

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°C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°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 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		

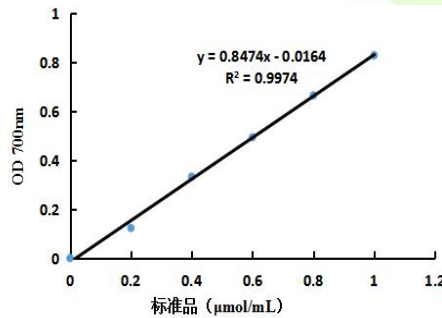
③ 显色反应：

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， ΔA=A 测定-A 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 150μL 减至 250μL，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 = 0.8474x - 0.0164，x 是标准品摩尔浓度（μmol/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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 17.7 \times (\Delta A + 0.0164) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算：

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

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 17.7 \times (\Delta A + 0.0164) \div W \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.15mL；

V2---酶促反应总体积，0.75mL；

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（50μmol/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. μmol/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。