

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

### 微量法 100 管/96 样

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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\text{NADP}^+$  产生  $\text{NADPH}$ ，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（ $10^4$  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 $\mu$ L:10 $\mu$ L:10 $\mu$ 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 $\mu$ L 样本和 190 $\mu$ 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  $\Delta A=A_2-A_1$ 。

**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。

$$\begin{aligned} \text{SP (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{SP (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1286 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{SP (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 2.572 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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。