

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

分光光度法 50 管/48 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 α -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 α -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 α -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 NADP^+ 产生 NADPH , 使 340nm 下吸光值增加。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 液体 100mL \times 1 瓶, 4 $^{\circ}$ C 保存;

试剂一: 液体 50mL \times 1 瓶, 4 $^{\circ}$ C 保存;

试剂二: 粉剂 \times 1 瓶, -20 $^{\circ}$ C 保存; 临用前加入 3mL 水溶解, 用不完的试剂分装后-20 $^{\circ}$ C 保存;

试剂三: 粉剂 \times 1 支, -20 $^{\circ}$ C 保存; 临用前加入 3mL 水溶解, 用不完的试剂分装后-20 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

测定步骤:

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零;

2、工作液的配制: 临用前将试剂一、试剂二、试剂三按照每个样本 850 μ L:50 μ L:50 μ L 的比例混合, 临用前配制, 半小时内使用。

3、在 1mL 石英比色皿中加入 50 μ L 样本和 950 μ L 工作液, 立即混匀, 记录 340nm 处 1min 时的吸光值 A_1 和 6min 时的吸光值 A_2 , 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。

$$\begin{aligned} \text{SP (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 943 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{SP (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 943 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{SP (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1.886 \times \Delta A \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05 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。