

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

分光光度法 50 管/48 样

**注 意：**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：

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×1 瓶，4℃ 保存；



---

试剂一：液体 50mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1瓶，-20℃保存；临用前加入3mL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3mL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<sup>4</sup>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、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 μL:50 μL:50 μL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 μL样本和950 μL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A=A2-A1。

#### 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。SP（nmol/min/mg prot）=[ $A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T$

$$=943 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

##### （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。SP (nmol/min/g 鲜重) = [     A×V

$$\text{反总} \div (\epsilon \times d) \times 109 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 943 \times \Delta A \div W$$

## (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。

$$SP (\text{nmol/min/104 cell}) = [A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.886 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $1 \times 10^{-3}$  L； $\epsilon$ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L/mol/cm； $d$ ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.05 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； $T$ ：反应时间，5 min； $C_{\text{pr}}$ ：样本蛋白质浓度，mg/mL； $W$ ：样本质量，g；细胞数量，500 万。