

淀粉磷酸化酶（SP）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PYHC5-M48	淀粉磷酸化酶（SP）活性检测试剂盒 说明书	48T	微量法
PYHC5-M96		96T	

一、测定意义：

淀粉磷酸化酶（Starch Phosphorylase, SP）在淀粉合成与降解中起关键作用，测定其活性，可研究植物、微生物或动物组织中的糖代谢调控机制。酶活性影响淀粉水解效率，可用于优化糖浆、酒精、发酵食品（如啤酒、面包）的生产工艺。淀粉磷酸化酶活性的测定不仅用于基础研究（如代谢调控），还在农业育种、食品加工、医药开发及生物制造等领域具有重要应用价值。

二、测定原理：

淀粉磷酸化酶催化葡萄糖-1-磷酸（G1P）与淀粉进行可逆反应，在合成方向（高 G1P 浓度），酶催化 G1P 生成淀粉并释放无机磷酸（Pi）。通过测定 Pi 的生成量，可计算酶活性。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 120mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 9mL×1 瓶	液体 18mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉体 ×2 瓶	2-8℃保存
试剂二：用时每瓶粉剂加入蒸馏水 3mL，混匀充分溶解，现用现配。			
试剂三	粉剂 ×1 支	粉体 ×2 支	-20℃保存
试剂三：用时每支粉剂加入蒸馏水 1.5mL，混匀充分溶解，现用现配。			
试剂四	液体 6mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	粉剂 ×1 瓶	粉体 ×2 瓶	2-8℃保存
试剂五：用时每瓶粉剂加入蒸馏水 5mL，混匀充分溶解，现用现配。			
试剂六	粉剂 ×1 瓶	粉体 ×2 瓶	2-8℃保存
试剂六：用时每瓶粉剂加入蒸馏水 5mL，混匀充分溶解，现用现配。			
试剂七	液体 5mL×1 瓶	液体 10mL×1 瓶	室温保存
定磷剂的配制：现用现配，按双蒸水:试剂五:试剂六:试剂七=2:1:1:1 的比例配制，配好的定磷剂应为浅黄色，若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染。			
标准品 10 μmol/mL	液体 1mL×1 支	液体 1mL×2 支	2-8℃保存

四、操作步骤：

样本前处理

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，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），旋涡混匀抽提3-5分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至660nm。
2. 测定前将试剂恢复至常温；
3. 将10 μmol/mL标准品用蒸馏水依次稀释至0、0.5、1、1.5、2、2.5 μmol/mL，备用；
4. 操作表（在离心管中加入以下试剂）：

	测定管	对照管
样品（μL）	10	-
试剂一（μL）	130	130
试剂二（μL）	40	40
试剂三（μL）	20	-
30℃孵育 10min		
试剂四（μL）	100	-
样品（μL）	-	10
离心 10min，取上清		

5. 显色反应（在96孔板中加入以下试剂）

	测定管	对照管	空白管	标准管
1μmol/mL 标准液（μL）	-	-	-	20
上清液（μL）	20	20	-	-
水（μL）	-	-	20	-
定磷试剂（μL）	200	200	200	200
混匀，45℃孵育 20min，冷却至室温后，于波长 660nm 酶标仪测定各管吸光度。分别记为 A _{空白} 、A _{标准} 、A _{对照} 、A _{测定} 。ΔA _{标准} = A _{标准} - A _{空白} ，ΔA _{测定} = A _{测定} - A _{对照} 。				

四、淀粉磷酸化酶（SP）活性计算：

1、标准曲线绘制：以 ΔA_{标准} 为横坐标，标准品浓度为纵坐标，绘制标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA 带入公式计算出样本浓度（y，μg/mL）；

2、淀粉磷酸化酶（SP）活性计算

(1) 按样本鲜重计算：

单位定义： 每克组织每分钟生成 1μg 无机磷为一个酶活力单位。

$$\text{淀粉磷酸化酶 (U/g 质量)} = y \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样总}} \div W \times V_{\text{样}}) = y \times W \times 30$$

(2) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克蛋白每分钟生成 1 μ g 无机磷为一个酶活力单位。

$$\text{淀粉磷酸化酶 (U/mg prot)} = y \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = y \times C_{\text{pr}} \times 30$$

V_{样总}：加入提取液体积，1 mL；

V_{反总}：反应体系总体积，0.3mL；

V_样：加入样本体积，0.01mL；

C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；

W：样本质量，g；

五、 注意事项：

- 1、实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测；
- 2、注意磷污染。