(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！)

产品货号：E-BC-K1205-M

产品规格：48T(48 samples)/96T(96 samples)

检测仪器：酶标仪(340 nm)

Elabscience®淀粉磷酸化酶（SP）比色法测试盒

Starch Phosphorylase (SP) Activity Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测植物组织中淀粉磷酸化酶（SP）的活力。

检测原理

淀粉磷酸化酶（Starch Phosphorylase，SP）分解底物产生葡萄糖-1-磷酸(α-D-glucose-1 phosphate)，在酶的作用下转化为葡萄糖-6-磷酸(α-D-glucose-6 phosphate)，并在脱氢酶的催化下还原 NAD^+/$NADP^+$产生 NADH/NADPH，在 340 nm 处吸光度值升高。

本试剂盒检测植物组织样本时，可测定总蛋白浓度，推荐使用考马斯亮蓝法(货号：E-BC-K168-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	55 mL×1 瓶	55 mL×2 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	反应液 (Reaction Solution)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8°C避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 A (Substrate A)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20°C避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 B (Substrate B)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8°C避光 保存 6 个月
	96 孔紫外酶标板	96 孔×1 块		无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(340 nm)，25°C恒温箱。

试剂：超纯水

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25°C。

② 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三，加入2 mL超纯水，充分混匀。未使用完的试剂，可分装-20°C保存一个月。

③ 试剂四工作液的配制：

取一支试剂四，加入2 mL超纯水，充分混匀。未使用完的试剂，可分装-20°C保存一个月。

④ 反应工作液的配制：

检测前配制反应工作液，按试剂二：试剂三工作液：试剂四工作液=3:1:1的体积比混匀，按需配制，半个小时内使用完毕。

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照样本质量（g）：试剂一体积（mL）=1：9的比例匀浆（如称取0.1 g的组织样本，加入0.9 mL的试剂一）。4℃，12000 × g离心10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：24-1400 U/g，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%土豆组织	不稀释	10%南瓜子组织	不稀释
10%玉米组织	不稀释	10%大蒜组织	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

① 严格把控检测时间，建议检测个数控制在 10 个以内。

② 反应工作液现用现配，建议在检测前配制。

操作步骤

① 取待测样本 20 μL 加入对应测定孔中。

② 向各孔加入 180 μL 反应工作液。

③ 酶标仪上振板 5 s，25°C条件下孵育 3 min，酶标仪 340 nm 处测定各孔 OD 值，记录为 A_1，25°C条件下再孵育 5 min，酶标仪 340 nm 处测定各孔 OD 值，记录为 A_2，$\Delta A = A_2 - A_1$。

操作表

	测定孔
样本(μL)	20
反应工作液(μL)	180
酶标仪上振板 5s，25°C条件下孵育 3 min，酶标仪 340 nm 处测定各孔 OD 值，记录为 A_1，25°C条件下再孵育 5 min，酶标仪 340 nm 处测定各孔 OD 值，记录为 A_2，$\Delta A = A_2 - A_1$。	

本试剂盒检测植物组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用考马斯亮蓝法(货号：E-BC-K168-M)。

结果计算

按样本质量计算：

定义：在 25°C条件下，每 g 组织样本每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{SP 活力 (U/g)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_1 \times 10^9 \div T \div (m \times \frac{V_2}{V_3}) \times f$$

$$= \Delta A \div m \times f \times 482.31$$

按蛋白浓度计算：

定义：在 25°C条件下，每 mg 组织蛋白每分钟生成 1nmol NADPH 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{SP 活力 (U/mgprot)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_1 \times 10^9 \div T \div (C_{pr} \times V_2) \times f$$

$$= \Delta A \div C_{pr} \times f \times 535.9$$

注解：

ΔA：$A_2 - A_1$

ε：NADPH 摩尔吸光系数，6220 L/(mol*cm)

d：光径，0.6 cm

V_1：反应体系总体积，0.0002 L

10^9：1 mol = 10^9 nmol

T：反应时间，5 min

m：称取样本的质量，g

V_2：上样体积，0.02 mL

V_3：样本处理过程中加入试剂一的体积，mL

f：加入检测体系前样本的稀释倍数

C_{pr}：待测样本的蛋白质浓度，mgprot/mL

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	24-1400 U/g	**批间差**	4.2-5.8%
灵敏度	24 U/g	**批内差**	3.7-5.3%

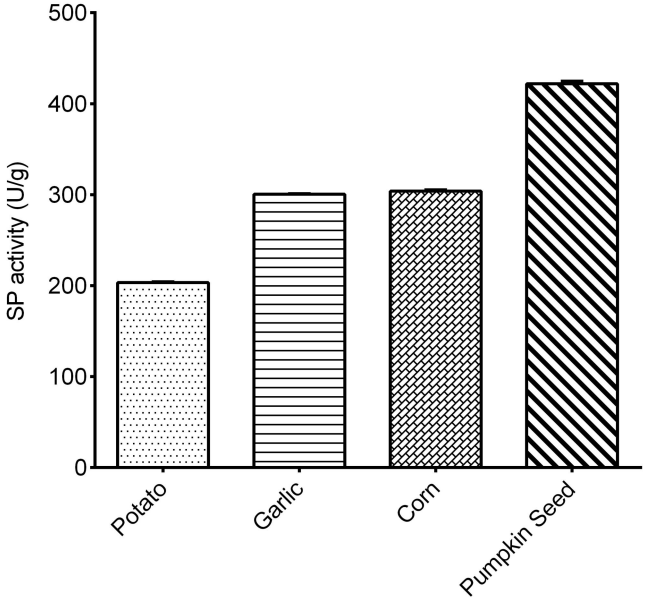
附录2 实例分析

例如土豆块茎组织 (数据仅供参考):

取10%土豆组织匀浆上清液20 μL，按操作表操作，结果如下：测定孔A_1值为0.407，测定孔A_2值为0.362，计算结果为：

$$\text{SP 活力 (U/g)} = (0.407-0.362) \div 0.1 \times 1 \times 482.31 = 217.04\ \text{U/g}$$

按照说明书操作，测定10%土豆组织(加样量20 μL)、10%大蒜样本(加样量20 μL)、10%玉米样本(加样量20 μL)、10%南瓜子(加样量20 μL)中淀粉磷酸化酶(SP)的活力(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本 OD 值过低	酶活较低	延长 A_2 反应时间至 10 min
	稀释倍数太大	减小稀释倍数
样本 OD 值过高	浓度太大	增加稀释倍数
	杂质过多	增加稀释倍数

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。