

使用说明书

Instruction Manual

ADPG 焦磷酸化酶(AGP)活性检测试剂盒 (微量法) ADPG Pyrophosphorylase Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophorylase, ADPase, AGP) (EC 2.7.7.21) 是植物合成淀粉和微生物合成糖原的一个限速酶, 催化由 1-磷酸葡萄糖与 ATP 反应形成腺苷二磷酸葡萄糖 (ADPG) 并释放能量的反应。了解 AGPase 对研究淀粉含量有重要的价值。

检测原理

腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase) 催化 1-磷酸葡萄糖生成 ADPG。AGPase 催化逆向反应生成 1-磷酸葡萄糖, 添加磷酸己糖变位酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶, 可生成 6-磷酸葡萄糖酸和 NADPH。在 340nm 下测定 NADPH 增加速率, 可计算出 AGPase 活性。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下:

组成	规格	储存条件
CB0015M-ES	100mL×1 瓶	4°C保存。
CB0015M-A	20mL×1 瓶	4°C保存。
CB0015M-B	粉剂×1 瓶	4°C保存; 临用前加入 6.4mL 蒸馏水充分溶解备用; 剩余试剂仍 4°C保存。
CB0015M-C	粉剂×1 瓶	-20°C保存; 临用前加入 4.8mL 蒸馏水充分溶解备用; 剩余试剂仍-20°C保存。

注: 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

二、粗酶液提取:

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 CB0015M-ES), 进行冰浴匀浆。10000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

三、测定步骤:

- 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- CB0015M-A 在 30°C水浴锅中预热 10min 以上。
- 在 EP 管中按顺序加入下列试剂 (如果一次性测定样本较多, 可以将 CB0015M-A 和 CB0015M-B 按比例配成混合液 1):

试剂名称	测定管 (μL)
CB0015M-A	40
CB0015M-B	64
样本	8
混匀, 30°C保温 15min, 置沸水浴中 1min (盖紧, 防止水分散失), 冰浴迅速冷却后加入下列试剂 (如果一次性测定样本较多, 可以将 CB0015M-A 和 CB0015M-C 按比例配成混合液 2)。	
CB0015M-A	120
CB0015M-C	48
混匀后立即转移 200μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中, 340nm 波长下记录初始吸光度 A1 和 2min 后的吸光度 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

四、AGP 酶活性计算公式:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

1. 按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$AGP \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 2813 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$AGP \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2813 \times \Delta A \div W$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2.8×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.008mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 2min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下:

1. 按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$AGP \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 5626 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$AGP \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 5626 \times \Delta A \div W$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2.8×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d : 96 孔板光径, 0.5cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.008mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 2min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量。

注意事项

1. 蛋白定量测定, 建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
3. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

