

ADPG 焦磷酸化酶(AGP)活性检测试剂盒

ADPG Pyrophosphorylase Assay Kit

微量法

货号: AK265

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES36	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK265-A	20mL×1 瓶	4℃保存;
AK265-B	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 6.4mL 蒸馏水充分溶解备用; 剩余试剂仍 4℃保存;
AK265-C	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 临用前加入 4.8mL 蒸馏水充分溶解备用; 剩余试剂仍-20℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophosphorylase, 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。

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。

自备用品:

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

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 提取液 ES36), 进行冰浴匀浆。10000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

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. AK265-A 在 30℃水浴锅中预热 10 min 以上。
3. 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 AK265-A 和 AK265-B 按比例配成混合液 1)

试剂名称	测定管 (μL)
AK265-A	40
AK265-B	64
样本	8
混匀, 30℃保温 15 min, 置沸水浴中 1 min (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 AK265-A 和 AK265-C 按比例配成混合液 2)	
AK265-A	120
AK265-C	48
混匀后立即转移 200 μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中, 340 nm 波长下记录初始吸光度 A1 和 2min 后的吸光度 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

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。

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

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

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。

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

注：V 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 样：加入样本体积，0.008 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：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。

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

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

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。

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

注：V 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 样：加入样本体积，0.008 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量。