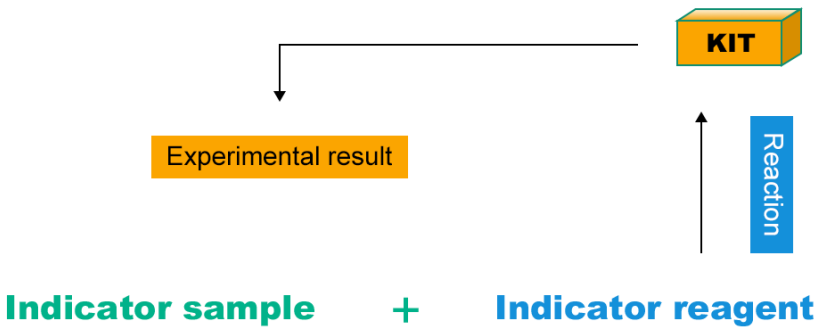
上海茁彩生物科技有限公司

ZCIBIO Technology Co.,Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO：ZC-S0531 Size：100T/96S

糖原磷酸化酶 a（GPa）检测试剂盒说明书

微量法

***正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定**

一、测定意义：

糖原磷酸化酶（Glycogen phosphorylase，GP，EC 2.4.1.1））是糖原分解代谢的关键酶，使糖原分子从非还原端逐个断开α-1，4-糖苷键移去葡萄糖基，释放1-磷酸葡萄糖，直至临近糖原分子α-1，6-糖苷键分支点前4个葡萄糖基处。GP分为有活性的糖原磷酸化酶 a（GPa）和无活性的糖原磷酸化酶 b（GPb）两种形式。糖原的分解主要在 GPa 的催化下进行。

二、测定原理：

未添加激活剂时，GPa催化糖原和无机磷产生葡萄糖残基生成糖原和1-磷酸葡萄糖，磷酸葡萄糖变位酶和6-磷酸葡萄糖脱氢酶进一步依次催化NADP还原生成NADPH，在340nm下测定NADPH上升速率，即可反映GPa活性。

三、需自备的仪器和用品：

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

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 16 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	粉剂×1 支	-20℃保存	
试剂四	粉剂×1 支	-20℃保存	

五、样本的前处理：

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。8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

六、测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零；

2、工作液的配制：临用前将试剂二转移到试剂一中混合溶解待用；用不完的试剂4℃可保存一周；

3、试剂三的配制：临用前在试剂三管中加入1mL蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂4℃可保存一周；

4、试剂四的配制：临用前在试剂四管中加入1mL蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂4℃可保存一周；

5、将工作液、试剂三和试剂四置于37℃预热5分钟；

6、在微量石英比色皿或 96 孔板（UV 板）中加入 10 μL 样本、10 μL 试剂三、10 μL 试剂四、10 μL 蒸馏水和 160 μL 工作液，立即混匀，记录 340nm 处 5min 后的 A1 和 10min 后的吸光值 A2，计算 ΔA=A2-A1。

七、GPa 活性计算：

- 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。

GPa（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10⁹]÷(V样×Cpr)÷T=643×ΔA÷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。

GPa（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10⁹]÷(W×V样÷V样总)÷T

=643×ΔA÷W

V反总：反应体系总体积，2×10^{-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，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。

- 用96孔板（UV板）测定的计算公式如下：

（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。

GPa（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^{9}]÷(V样×Cpr)÷T

=1286×ΔA÷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。

GPa（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^{9}]÷(W×V样÷V样总)÷T

=1286×ΔA÷W

V反总：反应体系总体积，2×10^{-4} L；ε：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^{3} L/mol/cm；d：96孔板（UV板）光径，0.05cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。