

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-S0532

Size: 100T/48S

糖原磷酸化酶 b (GPb) 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 $\alpha-1, 4$ -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 $\alpha-1, 6$ -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 (GP_a) 和无活性的糖原磷酸化酶 b (GP_b) 两种形式。GP_b 在一定浓度的腺苷酸 (5' -AMP) 存在下可被激活。

二、测定原理:

GP 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 GP 活性。添加一定浓度的腺苷酸 (5' -AMP) 时测定 GP (GP_a 和 GP_b) 活性, 未添加腺苷酸 (5' -AMP) 时测定 GP_a 活性, GP 活性 - GP_a 活性得到 GP_b 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、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	
试剂五	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；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
3. 试剂三的配制：临用前在试剂三瓶中加入 1mL 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

试剂四的配制：临用前在试剂四瓶中加入 1mL 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

4. 试剂五的配制：临用前在试剂五管中加入 500 μL 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂分装后 -20°C 保存，禁止反复冻融。
5. 将工作液、试剂三、试剂四和试剂五置于 37°C 预热 5 分钟；
6. 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 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 $\Delta\text{AGPa}=\text{A2}-\text{A1}$ 。
7. 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μL 样本、10 μL 试剂三、10 μL 试剂四、10 μL 试剂五和 160 μL 工作液，立即混匀，记录 340nm 处 5min 后的 A3 和 10min 后的吸光值 A4，计算 $\Delta\text{AGP}=\text{A4}-\text{A3}$ 。

注意：由于每个样本需要同时测一个 GP（GPa 和 GPb）活性和一个 GPa 活性，因此本试剂盒 100 管测 48 个样本。

七、GPb 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。

$$\text{GPb (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta\text{AGP} - \Delta\text{AGPa}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 643 \times (\Delta\text{AGP} - \Delta\text{AGPa}) \div \text{Cpr}$$

（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。

$$\text{GPb (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta\text{AGP} - \Delta\text{AGPa}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times (\Delta\text{AGP} - \Delta\text{AGPa}) \div W$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；

d ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：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。

● 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。

$$\text{GPb (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta \text{AGP} - \Delta \text{AGPa}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1286 \times (\Delta \text{AGP} - \Delta \text{AGPa}) \div \text{Cpr}$$

(3) 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。

$$\text{GPb (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta \text{AGP} - \Delta \text{AGPa}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times (\Delta \text{AGP} - \Delta \text{AGPa}) \div W$$

$V_{\text{反总}}$: 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 孔板光径, 0.5cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$: 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。