

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-S0533

Size: 100T/96S

UDPG 焦磷酸化酶 (UPG) 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:

UDPG 焦磷酸化酶是生物体糖原合成过程中的关键酶。在葡萄糖合成糖原前催化葡萄糖活化, 将1-磷酸葡萄糖与 UTP 分子合成为UDP-葡萄糖 (UDPG)。

二、测定原理:

UGP 可逆催化反应生成 1 磷酸葡萄糖, 在磷酸葡萄糖变位酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶作用下将 NADP 转化为 NADPH, 340nm 的吸光值增加速率反映了 UGP 活性。

三、需自备的仪器和用品:

天平、低温离心机、研钵、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板(ZC-1036: UV 板)。

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	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C避光保存	临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C避光保存	临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解
试剂四	粉剂×1 瓶	-20°C避光保存	临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解
试剂五	液体 2mL×1 瓶	4°C保存	

五、酶液提取

1. 组织: 按照质量 (g) 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g, 加入 1mL 提取液) 加入提取液, 冰浴匀浆后于 4°C, 10000g 离心 10min, 取上清置冰上待测。
2. 细胞: 按照细胞数量 (10^4 个) 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 提取液) 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min) 然后 4°C, 10000g 离心 10min, 取上清置冰上待测。
3. 液体: 直接检测。

六、测定操作

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 取 1mL 石英比色皿, 依次加入 100 μ L 试剂一, 20 μ L 试剂二, 20 μ L 试剂三, 20 μ L 试剂四, 20 μ L 试剂五, 20 μ L 粗酶液, 充分混匀, 记录 340nm 处 30s 的吸光值 A1 和 330s 的吸光值 A2, $\Delta A=A2-A1$

七、计算公式

- 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按照样本蛋白浓度计算

酶活单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活单位定义: 每克组织每分钟消耗 1nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /g)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活单位定义：每 10^4 个细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 321.54 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(4) 按照液体体积计算

酶活单位定义：每毫升液体每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 321.54 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.2mL； 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，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，5min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g

● 使用 96 孔板 (UV 板) 测定的计算公式如下

(1) 按照样本蛋白浓度计算

酶活单位定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活单位定义：每克组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /g)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活单位定义：每 10^4 个细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 643.08 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(4) 按照液体体积计算

酶活单位定义：每毫升液体每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 643.08 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.2mL； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：比色皿光径，0.5cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，5min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g

八、注意事项

配制好的试剂二、试剂三、试剂四 3 天内使用完。