

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-S0783

Size: 50T/24S

ADPG 焦磷酸化酶(AGP) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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:

AGP (EC 2.7.7.21) 主要存在于植物中, 催化葡萄糖-1-磷酸与ATP反应生成淀粉合成的直接前体 ADPG, 是植物淀粉生物合成的主要限速步骤。

二、测定原理:

AGP催化的逆向反应生成G1P, 在反应体系中添加的磷酸己糖变位酶和6-磷酸葡萄糖脱氢酶依次催化生成6-磷酸葡萄糖酸和NADPH, 340nm下测定NADPH增加速率, 即可计算AGP活性。

三、需自备的仪器和用品:

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

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 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 支	4℃保存	临用前加入 250 μL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂仍 4℃保存;
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 2mL 蒸馏水充分溶解备用; 用 不完的试剂仍 4℃保存;
试剂四	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 3mL 蒸馏水充分溶解备用; 用 不完的试剂仍 4℃保存

试剂五	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前加入 3mL 蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂仍-20℃保存；
试剂六	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前加入 250 μL 蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂 4℃保存；
试剂七	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前加入 250 μL 蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂 4℃保存；

五、粗酶液制备

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。10000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

六、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、试剂一置30℃保温10min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, 可以将试剂一、二、三和四按比例配成混合液 1, 将试剂一、五、六和七按比例配成混合液 2)

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	100
试剂二	10
试剂三	50
试剂四	100
样本	20
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	
试剂一	300
试剂五	100
试剂六	10
试剂七	10

混匀后立即在340nm 波长下记录初始吸光度A1和2min后的吸光度 A2, 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

七、AGP 活性计算

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。

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

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

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。

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

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 7×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 mol/L/cm;
 d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T :
反应时间, 2 min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量。