

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-S0818

Size: 50T/24S

糖原磷酸化酶 b (GPb) 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：

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 (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、台式离心机、可调式移液器、1mL 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	60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 40 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 2.5mL 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. 试剂四的配制：临用前在试剂四瓶中加入 2.5mL 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。
5. 试剂五的配制：临用前在试剂五管中加入 1.25mL 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。
6. 将工作液、试剂三、试剂四和试剂五置于 37℃预热 5 分钟；

7. 1mL 石英比色皿中加入 50 μ L 样本、50 μ L 试剂三、50 μ L 试剂四、50 μ L 蒸馏水和800 μ L 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 $\Delta AGPa=A2-A1$ 。

8. 在1mL 石英比色皿中加入 50 μ L 样本、50 μ L 试剂三、50 μ L 试剂四、50 μ L 试剂五和800 μ L 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 $\Delta AGP=A4-A3$ 。

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50 管测 24 个样本。

七、GPb 活性计算：

（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。

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

（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。

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

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L; 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, 0.05 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL;

T : 反应时间, 5 min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g。