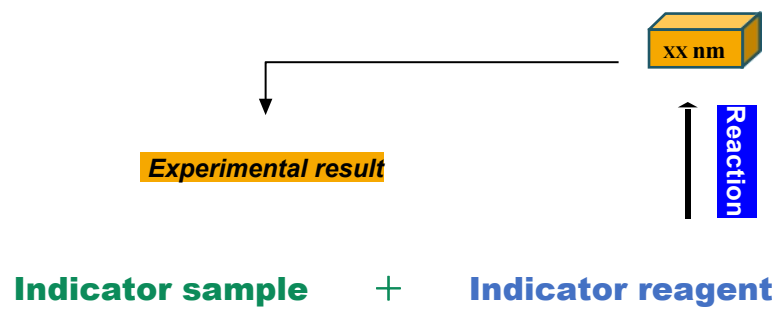


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（AGP）活性测定试剂盒说明书 微量法

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

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。

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。

需自备的仪器和用品

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、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

试剂的组成和配制

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℃保存	—
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入6.4mL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	-20℃保存	临用前加入4.8mL蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂仍-20℃保存；

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。

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、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，可以将试剂一和试剂二按比例配成混合液 1）

试剂名称（μL）	测定管
试剂一	40
试剂二	64
样本	8
混匀，30℃保温15min，置沸水浴中1min（盖紧，防止水分散失），冰浴迅速冷却后加入下列试剂（如果一次性测定样本较多，可以将试剂一和试剂三按比例配成混合液 2）	
试剂一	120
试剂三	48

混匀后立即转移 200 μL至微量石英比色皿或 96 孔板中，340nm波长下记录初始吸光度A1和 2min后的吸光度A2，计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

AGP 活性计算

a. 使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 反总：反应体系总体积， 2.8×10^{-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，0.008 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量。

b. 使用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。

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

$$= 5626 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

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

$$= 5626 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积， 2.8×10^{-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 样：加入样本体积，0.008 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量。