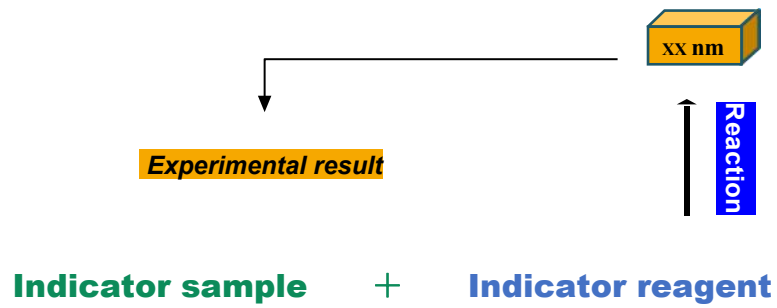


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

糖原磷酸化酶a (GP_a) 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

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。糖原的分解主要在 GP_a 的催化下进行。

测定原理：

未添加激活剂时，GP_a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_a活性。

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 (UV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	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	-

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。

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4℃可保存一周；
- 3、试剂三的配制：临用前在试剂三管中加入1mL蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂4℃可保存一周；
- 4、试剂四的配制：临用前在试剂四管中加入1mL蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂4℃可保存一周；
- 5、将工作液、试剂三和试剂四置于37℃预热5分钟；
- 6、在微量石英比色皿或96孔板 (UV板) 中加入10 μ L样本、10 μ L试剂三、10 μ L试剂四、10 μ L蒸馏水和160 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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

GPa 活性计算:

a. 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。

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

(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。

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

V 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: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 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。

b. 用96孔板 (UV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。

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

(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。

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

V 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, 0.05cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 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。