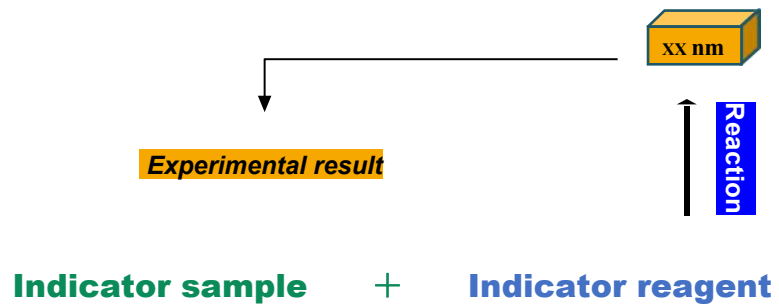


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 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

#### 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 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；

### 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 340 nm 波长下记录初始吸光度 A1 和 2min 后的吸光度 A2, 计算  $\Delta A = A2 - A1$ 。

### 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 反总: 反应体系总体积,  $7 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADPH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  mol/L/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.02 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。