

ADPG 焦磷酸化酶(AGP)活性检测试剂盒

ADPG Pyrophosphorylase Assay Kit

微量法

货号：AK265

规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

| 编号 | 规格 | 储存条件 |
|----------|-----------|---|
| 提取液 ES36 | 100mL×1 瓶 | 4℃保存； |
| AK265-A | 20mL×1 瓶 | 4℃保存； |
| AK265-B | 粉剂×1 瓶 | 4℃保存；临用前加入 6.4mL 蒸馏水充分溶解备用；剩余试剂仍 4℃保存； |
| AK265-C | 粉剂×1 瓶 | -20℃保存；临用前加入 4.8mL 蒸馏水充分溶解备用；剩余试剂仍-20℃保存； |

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophorylase, AGPase, AGP) (EC 2.7.7.21) 是植物合成淀粉和微生物合成糖原的一个限速酶，催化由 1-磷酸葡萄糖与 ATP 反应形成腺苷二磷酸葡萄糖 (ADPG) 并释放能量的反应。了解 AGPase 对研究淀粉含量有重要的价值。

原理：腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase) 催化 1-磷酸葡萄糖生成 ADPG。AGPase 催化逆向反应生成 1-磷酸葡萄糖，添加磷酸已糖变位酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶，可生成 6-磷酸葡萄糖酸和 NADPH。在 340nm 下测定 NADPH 增加速率，可计算出 AGPase 活性。

自备用品：

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。

粗酶液提取：

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 ES36)，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. AK265-A 在 30℃水浴锅中预热 10 min 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 AK265-A 和 AK265-B 按比例配成混合液 1）

| 试剂名称 | 测定管 (μL) |
|---------|----------|
| AK265-A | 40 |
| AK265-B | 64 |
| 样本 | 8 |

混匀，30℃保温 15 min，置沸水浴中 1 min（盖紧，防止水分散失），冰浴迅速冷却后加入下列试剂（如果一次性测定样本较多，可以将 AK265-A 和 AK265-C 按比例配成混合液 2）

| | |
|---------|-----|
| AK265-A | 120 |
| AK265-C | 48 |

混匀后立即转移200 μL 至微量石英比色皿或96 孔板中，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 酶活性计算公式：

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。

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

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

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。

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

注： 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。

$$\text{AGP (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 5626 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

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。

$$\text{AGP (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 5626 \times \Delta A \div W$$

注： 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。