



糖原磷酸化酶 a 活性检测试剂盒

GPa Assay Kit

微量法

产品编号: AK493M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES493	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK493-A	16 mL×1 瓶	4℃保存;
AK493-B	粉剂×1 瓶	-20℃保存;
AK493-C	粉剂×1 支	-20℃保存;
AK493-D	粉剂×1 支	-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: 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 (GPa) 和无活性的糖原磷酸化酶 b (GPb) 两种形式。糖原的分解主要在 GPa 的催化下进行。

原理: 未添加激活剂时, GPa 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 GPa 活性。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

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 ES493), 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. 试剂配制:

(1) 工作液的配制: 临用前将 AK493-B 转移到 AK493-A 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。用前置于 37℃ 预热 5 分钟。

(2) AK493-C 的配制: 临用前在 AK493-C 管中加入 1mL 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。用前置于 37℃ 预热 5 分钟。

(3) AK493-D 的配制: 临用前在 AK493-D 管中加入 1mL 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。用前置于 37℃ 预热 5 分钟。

3. 样本测定 (石英比色皿或 96 孔板中加入)

试剂名称	测定管 (ul)
样品	10
AK493-C	10
AK493-D	10
蒸馏水	10

工作液	160
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。

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

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。

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

注: 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。

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

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。

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

注: 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, 0.5cm; 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。

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