

腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophosphorylase, AGP) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

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/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

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 9mL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融;

试剂三: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存; 临用前加入 4mL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融;

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

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	50
试剂二	80
样本	10

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, 4000g 4℃ 离心 5min, 取上清液, 在 96 孔板中依次加入下列试剂

上清液	80
试剂一	85
试剂三	35

混匀后, 立即于 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

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。

$$\text{AGP (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times \text{稀释倍数} \\ = 2813 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

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

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，0.01mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；稀释倍数：1.75；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。

$$\text{AGP (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times \text{稀释倍数} \\ = 5627 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{AGP (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times \text{稀释倍数} \\ = 5627 \times \Delta A \div W$$

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，0.5cm；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，2 min；稀释倍数：1.75；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量。