

腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（AGP）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号：AC10148

规格：25T/24S、50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称/规格	25T	50T	保存条件
提取液	液体 25 mL×1 瓶	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4°C保存
试剂四	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂五	液体 250 μL×1 支	液体 250 μL×2 支	-20°C保存

25T 溶液的配制：

1. 试剂二：临用前每支加入 4 mL 双蒸水充分溶解备用；用不完的试剂-20°C分装保存；
2. 试剂三：临用前加入 3 mL 双蒸水充分溶解备用；用不完的试剂-20°C分装保存；
3. 试剂四：临用前每支加入 500 μL 双蒸水充分溶解备用；用不完的试剂-20°C分装保存；

50T 溶液的配制：

1. 试剂二：临用前每支加入 8 mL 双蒸水充分溶解备用；用不完的试剂-20°C分装保存；
2. 试剂三：临用前加入 3 mL 双蒸水充分溶解备用；用不完的试剂-20°C分装保存；
3. 试剂四：临用前每支加入 500 μL 双蒸水充分溶解备用；用不完的试剂-20°C分装保存；

产品说明：

AGP (EC 2.7.7.21)主要存在于植物中，催化葡萄糖-1-磷酸(G-1-P)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。

AGP催化的逆向反应生成G-1-P，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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL石英比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

称取约 0.1g 组织加入 1mL 提取液，冰浴中匀浆。10000g，4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

二、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、在EP管中按顺序加入下列试剂：

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	100
试剂二	160
样本	20
混匀，30°C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、试剂三置 37°C保温 10min 以上。	
试剂一	300
试剂三	100
试剂四	20
试剂五	10

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

三、AGP 活性计算

1. 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生1nmol NADPH定义为一个酶活性单位。

$$\text{AGP活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div T \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) = 380.5 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（此法需要自行测定粗酶液蛋白质浓度）

2. 按样本质量计算

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟催化产生1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{AGP活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div T \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) = 380.5 \times \Delta A \div W$$

T: 反应时间, 15min; ϵ : NADPH消光系数, $6.22 \times 10^{-3} \text{ mL/nmol/cm}$; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.71mL; d: 石英比色皿光程, 1cm; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; $V_{\text{样本}}$: 加入的样本体积, 0.02mL; $V_{\text{提取}}$: 加入的提取液体积, 1mL; W: 样本质量, g。

注意事项：

1、如果一次性测定样本较多，可以将试剂一、二按比例配成混合液1，将试剂一、三、四和五按比例配成混合液2。

实验实例：

1、取 0.1g 柳树加入 1mL 提取液冰浴中匀浆。10000g，4°C离心 10min，取上清置冰上，之后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A2 - A1 = 0.55 - 0.491 = 0.059$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{AGP 活性 (U/g 质量)} = 380.5 \times \Delta A \div W = 224.495 \text{ U/g 质量。}$$

参考文献：

[1] Baroja-Fernández E, Zandúeta-Criado A, Rodríguez-López M, et al. Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphatase and ADPglucose pyrophosphorylase occur in the suspension - cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.)[J]. FEBS letters, 2000, 480(2-3): 277-282.