

糖原磷酸化酶 a (GP_a) 活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

货号：AC10582

规格：50T/48S

产品内容：

提取液：60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 40mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：粉剂×1 支，-20℃保存；

试剂四：粉剂×1 支，-20℃保存；

产品说明：

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 (GP_a) 和无活性的糖原磷酸化酶 b (GP_b) 两种形式。糖原的分解主要在 GP_a 的催化下进行。

未添加激活剂时，GP_a 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GP_a活性。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、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。

操作步骤：

一、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提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃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、工作液的配制：临用前将试剂二转移到试剂一中混合溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
- 3、试剂三的配制：临用前在试剂三瓶中加入2.5mL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。
- 4、试剂四的配制：临用前在试剂四瓶中加入 2.5mL 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。
- 5、将工作液、试剂三和试剂四置于 37℃预热5分钟；
- 6、在1mL石英比色皿中加入50 μ L样本、50 μ L试剂三、50 μ L试剂四、50 μ L蒸馏水和800 μ L工作液，

立即混匀，记录340nm处5min后的A1和10min后的吸光值A2，计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

三、GPa 活性计算：

(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。

$$\begin{aligned} \text{GPa (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 643 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{GPa (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 643 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} 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，0.05 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。