

腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(AGP)活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-DF004 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

ADPG 焦磷酸化酶(AGP, EC 2.7.7.27)是植物淀粉合成过程中起关键性调节作用的酶, 催化 1-磷酸葡萄糖(G-1-P)与三磷酸腺苷(ATP)反应形成淀粉合成的直接前体腺苷二磷酸葡萄糖(ADPG), 在植物中, 主要存在于贮藏器官和叶片中。

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。

二、测试盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉体 1 支	-20°C 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解, 仍 -20°C 保存。
试剂二	粉体 1 支	4°C 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解, 仍 4°C 保存。
试剂三	液体 13mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	粉体 1 瓶	-20°C 避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 2.1mL 蒸馏水溶解, 仍 -20°C 保存。

【注】: 粉剂量在 mg 级别, 使用前用手甩几次或者进行离心, 打开直接加入要求的试剂即可。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(AGP)活性测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.2g), 加 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 也可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

【注意】若样本颜色较深(如较深颜色的植物叶片), 可引起起始值 A1 值较大如超过 1.5, 可在样本提取过程中增加除色素步骤: 取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 的 80% 乙醇冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C 离心 10min, 弃掉色素较深的上清液; 以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液, 混匀或再次冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清置冰上待测。

② 液体样品: 澄清的液体样本直接检测; 若浑浊则离心后取上清液检测。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，设定温度为 30°C。
- ② 所有试剂解冻至室温（25°C），在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	120
轻轻混匀，30°C 孵育 10min。	
试剂四	20
轻轻混匀，反应开始，30°C 条件下，30S 在 340nm 处读取吸光值 A1，30min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【注】1. 若 ΔA 在零附近徘徊，可延长反应时间 T 至 60min 后或更长读取 A2；或加大样本上样量 V1（如增至 80μL，则试剂三相应减少，保持总体积不变）；或增加样本取样质量 W；则改变后的 T 和 V1 以及 W 需代入计算公式重新计算；
2. 若上升趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性上升的时间段来参与计算，相对应的 A1 和 A2 值也代入计算公式重新计算。
3. 若 ΔA 的值大于 0.4，需缩减反应时间 T（如减至 10min 或更短），或减少样本上样量 V1（如减至 20μL，则试剂三相应增加，保持总体积不变）；则改变后反应时间 T 和 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{AGP}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 53.6 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按照样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{AGP}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 53.6 \times \Delta A \div W$$

3、按照液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{AGP}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 53.6 \times \Delta A$$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

$V1$ ---加入样本体积，0.04mL;

d ---光径，0.5cm;

W ---样本质量，g；

Cpr ---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

V ---加入提取液体积，1mL;

$V2$ ---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

T ---反应时间，30min;