

尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UGP) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TY004-48 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

UDPG 焦磷酸化酶 (UGP, EC 2.7.7.9) 是碳水化合物代谢的重要指标之一, 广泛分布于自然界中, 在微生物及动植物的许多组织中都有存在。催化葡萄糖活化, 将 1-磷酸葡萄糖与 UTP 分子合成为 UDP-葡萄糖 (UDPG)。为各类碳水化合物包括蔗糖、葡聚糖、纤维素、半纤维素、果胶质、糖蛋白等的合成提供葡萄糖基。

UGP 可逆催化反应生成 1 磷酸葡萄糖, 在磷酸葡萄糖变位酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶作用下将 NADP 转化为 NADPH, 340nm 的吸光值增加速率反映了 UGP 活性。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	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 0.6mL 试剂一混匀溶解, 可-20°C 分装保存。
试剂三	粉体 1 瓶	4°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 3mL 去离子水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	粉体 1 瓶	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 3mL 去离子水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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、尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UGP) 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。

② 细胞样本:

取 500 万细胞加入 1mL 提取液; 超声波破碎细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细胞数量 (104 个) : 提取液体积 (mL) 为 1000~5000: 1 比例进行提取。

③ 液体样品: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min, 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	10
试剂一	80
试剂二	10
试剂三	50
轻轻混匀, 30°C 孵育 10min。	
试剂四	50
轻轻混匀, 反应开始, 1min 时在 340nm 处读取吸光值 A1, 5min 时读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【注】1.若 ΔA 的值在零附近, 可以适当延长反应时间 T (如由 5min 延长到 10min 读取 A2) ; 或加大样本上样量 V1 (如: 由 10μL 增加到 20μL, 则试剂一相应减少, 保持总体积 200μL 不变) ; 或者增加样本质量 W (如由 0.1g 增加到 0.2g) 。改变后的 V1 和 T 和 W 代入计算公式重新计算
 2. 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高) , 可以适当减少样本加样 V1(如由 10μL 减至 5μL, 则补充 5μL 蒸馏水或试剂一), 则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。
 3. 若 ΔA 大于 0.6, 可减少样本加样体积 V1 (如减至 5μL, 则补充 5μL 蒸馏水或试剂一) 或减少反应时间 T (如由 5min 减至 3min 读取 A2) , 则改变后的 V1 和 T 代入计算公式重新计算。
 4. 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。

五、结果计算:

1、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol 的 NADP⁺定义为一个酶活力单位。

$$UGP(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 1607.8 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按照样本质量计算:

酶活定义: 每克组织每分钟消耗 1nmol 的 NADP⁺定义为一个酶活力单位。

$$UGP(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 1607.8 \times \Delta A \div W$$

3、按照细胞数量计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每分钟消耗 1nmol 的 NADP⁺定义为一个酶活力单位。

$$UGP(\text{nmol/min/10}^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 3.2 \times \Delta A$$

4、按照液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟消耗 1nmol 的 NADP⁺定义为一个酶活力单位。

$$UGP(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 1607.8 \times \Delta A$$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; V ---加入提取液体积, 1mL;

$V1$ ---加入样本体积, 0.01mL;

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

d ---96 孔板光径, 0.5cm;

T ---反应时间, 4min;

500---细胞总数, 500 万;

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。