

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 微板法 96 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 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 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 1 支	-20℃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 试剂一溶解, 仍 -20℃保存。
试剂三	粉体 1 瓶	4℃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 5.4mL 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℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 5.4mL 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℃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℃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 的比例进行提取

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℃。

② 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℃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 差值在零附近徘徊，可以延长反应时间 20min 后读取 A2，则相应的反应时间 T 则代入计算公式重新计算；

或者加大样本上样量（如：由 10μL 增加到 20μL，则试剂一相应减少，保持总体积 200μL 不变），改变后的加样体积即 V1 代入计算公式重新计算；

或者由 0.1g 样本取样量增加到 0.2g，加 1mL 的提取液研磨提取。

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。

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 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按照样本质量计算

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

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

(3) 按照细胞数量计算

酶活定义：每 104 个细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ = 3.2 \times \Delta A$$

(4) 按照液体体积计算

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

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

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

V1---加入样本体积，0.01mL；

d---96 孔板光径，0.5cm；

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，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。

