

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-F-DF004-100 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×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 32mL×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、所需的仪器和用品:

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)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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, 可在样本制备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、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 设定温度为 30°C, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C) , 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	100
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	540
	轻轻混匀, 30°C 孵育 10min。
试剂四	40
	轻轻混匀, 反应开始, 30°C 条件下, 1min 后在 340nm 处 读取吸光值 A1, 30min 后读取 A2, ΔA=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 200μL, 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, 需缩短反应时间 T(如减至 10min 或更短), 或减少样本上样量 V1(如减至 50μL, 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。

$$AGP(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 38.6 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$AGP(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 38.6 \times \Delta A \div W$$

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。

$$AGP(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 38.6 \times \Delta A$$

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, 0.1mL; $V2$ --反应体系总体积, $7.2 \times 10^{-4} \text{ L}$;
 d --比色皿光径, 1cm; T --反应时间, 30min;
 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。