

## 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophosphorylase,

## AGP) 活性测定试剂盒说明书

(货号: G0536F 分光法 48 样)

## 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℃保存	
试剂一	粉体mg×1支	-20℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再加1.1mL蒸馏水溶解,仍-20℃保存。
试剂二	粉体mg×1支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再加1.1mL蒸馏水溶解。仍4℃保存。
试剂三	液体32mL×1瓶	4℃保存	
试剂四	粉体mg×1支	-20℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再加2.1mL蒸馏水溶解,仍-20℃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:

可见分光光度计、1ml 石英比色皿(光径 1cm)、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

## 四、腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (AGP) 活性测定:

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℃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 80%乙醇冰浴匀浆,12000rpm,4℃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℃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℃,蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温(25℃),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℃孵育 10min。	
试剂四	40
轻轻混匀，反应开始，30℃条件下，1min 后在 340nm 处读取吸光值 A1，30min 后读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

- 【注】1. 若 $\Delta A$  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 200 $\mu$ L，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 $\Delta A$  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 50 $\mu$ L，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。

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

### 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。

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

### 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。

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

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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， $7.2 \times 10^{-4}$  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。