

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: G0536W48 微板法 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、试剂盒组成和配制:

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mg×1支	-20°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再加 0.65mL蒸馏水溶解,可-20°C分装保存。
试剂二	粉体mg×1支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再加 0.65mL蒸馏水溶解。仍4°C保存。
试剂三	液体7mL×1瓶	4°C保存	
试剂四	粉体mg×1支	-20°C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°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:

酶标仪、96 孔板、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°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 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),或可放在 25°C 条件下水浴 15min 左右。

③ 在 96 孔板中按照下表依次加入:

试剂名称 (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, 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 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。

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

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。

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

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。

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

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

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.04mL;

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

d---光径, 0.5cm;

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。