

尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-glucose pyrophosphorylase, UGP) 试剂盒说明书

(货号: G0535W48 微板法 48 样)

一、产品简介:

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 | 液体6mL×1瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂二 | 粉体×1支 | -20°C保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部, 再加0.6mL试剂一混匀溶解, 可-20°C分装保存。 |
| 试剂三 | 粉体mg×1支 | 4°C保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 3mL 去离子水溶解备用。 |
| 试剂四 | 粉体mg×1支 | 4°C保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 3mL 去离子水溶解备用。 |

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、天平、低温离心机、研钵、蒸馏水。

四、尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UGP) 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。

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(10^4 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、上机检测:

① 打开酶标仪, 设定波长至 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:

| 试剂名称 (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, $\Delta A = A2 - A1$ 。 | |

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。

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

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。

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

3、按照细胞数量计算：

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

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

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。

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

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

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, 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。