

ADP-Glucose Pyrophosphorylase Activity Assay Kit

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：G0536F | 方法：可见分光法 | 规格：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1.1mL蒸馏水溶解, 仍-20°C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mg×1支	-20°C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°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：

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°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），或可放在 25°C 条件下水浴 15min 左右。

③ 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, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；

针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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。

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

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, 0.1mL；

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。