

糖原磷酸化酶 b (GPb) 试剂盒说明书

(货号: G0565F 分光法 24 样)

一、产品简介:

糖原磷酸化酶 (Glycogen phosphorylase, GP, EC 2.4.1.1) 是糖原分解代谢的关键酶, 使糖原分子从非还原端逐个断开 α -1, 4-糖苷键移去葡萄糖基, 释放 1-磷酸葡萄糖, 直至临近糖原分子 α -1, 6-糖苷键分支点前 4 个葡萄糖基处。GP 分为有活性的糖原磷酸化酶 a (GPa) 和无活性的糖原磷酸化酶 b (GPb) 两种形式。GPb 在一定浓度的腺苷酸 (5' -AMP) 存在下可被激活。

本试剂盒提供一种快速, 灵敏和简便的检测方法, GP 催化糖原和无机磷产生葡萄糖残基生成糖原和 1-磷酸葡萄糖, 磷酸葡萄糖变位酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶依次催化 NADP+还原成 NADPH, 接着与特异显色剂反应生成有色物质, 通过检测该有色物在 450nm 的增加速率, 进而计算出 GP 酶活性大小。添加一定浓度的腺苷酸 (5' -AMP) 时测定 GP (GPa 和 GPb) 活性, 未添加腺苷酸 (5' -AMP) 时测定 GPa 活性, GP 活性-GPa 活性得到 GPb 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	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存。
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存。
试剂三	粉剂 mg×1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂四	液体 2mL×1 支	4°C保存	
试剂五	液体 32mL×1 瓶	4°C保存	
试剂六	粉剂 mg×1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 2.4mL 蒸馏水充分溶解备用。
标准品	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰。

四、糖原磷酸化酶 b (GPb) 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, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4°C离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取

② 细胞样本: 先收集细胞到离心管内, 离心后弃上清; 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); 4°C 约 12,000rpm 离心 10min, 取上清作为待测样品。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

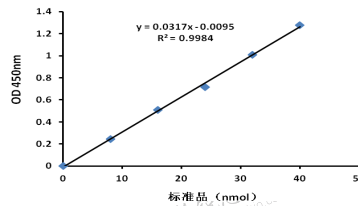
① 可见分光光度计预热 30min 以上, 设置温度 30°C, 调节波长至 450nm, 蒸馏水调零。

② 试剂放在 30°C 水浴 5min; 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	40	
试剂二	20	20
试剂三	20	20
试剂四	40	40
试剂五	600	640
混匀, 30°C 条件下孵育 10min		
试剂六	40	40
混匀, 30°C 条件下, 2min 时立即于 450nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定-A 对照 (每个样本需做一个样本自身对照)。		

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0317x - 0.0095$, x 是标准品摩尔质量: nmol, y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟使 1nmol NADP⁺ 转换成 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$GPb(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0095) \div 0.0317] \div (V1 \times Cpr) \div T = 394.3 \times (\Delta A + 0.0095) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每分钟使 1nmol NADP⁺ 转换成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$GPb(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0095) \div 0.0317] \div (W \times V1 \div V) \div T = 394.3 \times (\Delta A + 0.0095) \div W$$

4、按细胞数量计算:

单位定义: 每 10⁴ 个细胞每分钟使 1nmol NADP⁺ 转换成 1nmol NADPH 为一个酶活力单位。

$$GPb(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0095) \div 0.0317] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.79 \times (\Delta A + 0.0095)$$

5、按液体体积计算:

单位定义: 每毫升液体每分钟使 1nmol NADP⁺ 转换成 1nmol NADPH 为一个酶活力单位。

$$GPb(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0095) \div 0.0317] \div V1 \div T = 394.3 \times (\Delta A + 0.0095)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.04 mL;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 2 min;

500---细胞数量, 万;

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。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (1nmol/μL): 向标准品 EP 管里面加入 0.6mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且 -20°C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 nmol/μL。
- 3 依据加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。