

Glycogen phosphorylase b Activity Kit

糖原磷酸化酶 b (GPb) 试剂盒说明书

货号: G0565W | 方法: 微板法 | 规格: 48 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 (GP_a) 和无活性的糖原磷酸化酶 b (GP_b) 两种形式。GP_b 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 (GP_a 和 GP_b) 活性, 未添加腺苷酸 (5' -AMP) 时测定 GP_a 活性, GP 活性减去 GP_a 活性得到 GP_b 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 0.6mL 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 1mL×1 支	4°C保存	
试剂五	液体 15mL×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 1.1mL 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:

酶标仪、96 孔板、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 (GP_b) 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（10⁴）：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 酶标仪预热 30min 以上，设置温度 30℃,调节波长至 450nm。

② 试剂放在 30℃水浴 5min；

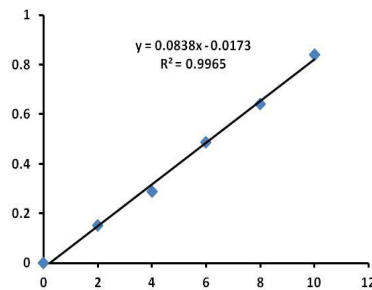
③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	10	
试剂二	10	10
试剂三	10	10
试剂四	10	10
试剂五	140	150
混匀，30℃条件下孵育 10min		
试剂六	10	10
混匀，30℃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）。		

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、标准曲线方程： $y = 0.0838x - 0.0173$ ，x 是标准品摩尔质量：nmol，y 是 ΔA 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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。

$$GPb(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0173) \div 0.0838] \div (V1 \times Cpr) \div T = 596.7 \times (\Delta A + 0.0173) \div Cpr$$

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 定义为一个酶活单位。

$$GPb(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0173) \div 0.0838] \div (W \times V1 \div V) \div T = 596.7 \times (\Delta A + 0.0173) \div W$$

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 定义为一个酶活单位。

$$GPb(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0173)\div 0.0838]\div(500\times V1\div V)\div T=1.19\times(\Delta A+0.0173)$$

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 定义为一个酶活单位。

$$GPb(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[(\Delta A+0.0173)\div 0.0838]\div V1\div T=596.7\times(\Delta A+0.0173)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.01 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。