

ADPG 焦磷酸化酶/腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(AGP)活性检测试剂盒

剂盒说明书

(货号：ADS-F-DF004-24 分光法 24 样)

有效期：3 个月

测定意义

AGP (EC 2.7.7.21)主要存在于植物中，催化葡萄糖-1-磷酸与 ATP 反应生成淀粉合成的直接前体 ADPG，是植物淀粉生物合成的主要限速步骤。

测定原理

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。

需自备的的仪器和用品

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水

试剂的组成和配制

提取液：液体 30mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 支，4℃ 保存；临用前加入 250μL 双蒸水充分溶解备用；用不完的试剂仍 4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 2mL 双蒸水充分溶解备用；用不完的试剂仍 4℃ 保存；

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 3mL 双蒸水充分溶解备用；用不完的试剂仍 4℃ 保存；

试剂五：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；临用前加入 3mL 双蒸水充分溶解备用；用不完的试剂仍-20℃ 保存；

试剂六：粉剂×1 支，-20℃ 保存；临用前加入 250μL 双蒸水充分溶解备用；用不完的试剂 4℃ 保存；

试剂七：粉剂×1 支，-20℃ 保存；临用前加入 250μL 双蒸水充分溶解备用；用不完的试剂 4℃ 保存；

粗酶液制备

称取约 0.1g 组织加入 1mL 提取液，冰浴中匀浆。10000g ， 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤（在 1.5mL EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称（ μL ）	测定管
试剂一	100
试剂二	10
试剂三	50
试剂四	100
样本	20

混匀，30℃保温 15 min，置沸水浴中 1 min（盖紧，防止水分散失），冰浴迅速冷却

试剂五	100
试剂一	300
试剂六	10
试剂七	10

混匀后立即在 340 nm 波长下记录初始吸光度 A1 和 2min 后的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

AGP 活性计算

1、按蛋白含量计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{AGP (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 2814 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2、按照样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{AGP (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$$

$$= 2814 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应体系总体积， 7×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.02 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量。