

糖原磷酸化酶 b (GPb) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TY003 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存。
试剂二	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存。
试剂三	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 2mL×1 支	4℃避光保存	
试剂五	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、糖原磷酸化酶 b (GPb) 活性测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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℃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℃ 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、检测步骤：

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：

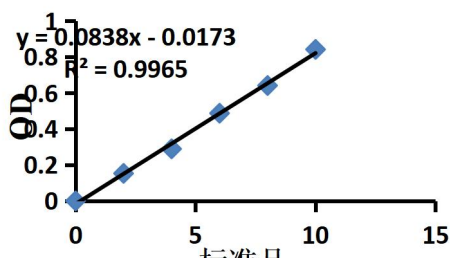
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	10	
试剂二	10	10
试剂三	10	10
试剂四	10	10
试剂五	140	150
混匀，30℃条件下孵育 10min		
试剂六	10	10
混匀，30℃条件下，2min 时立即于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A - A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需做一个样本自身对照）。		

【注】：1. 若 ΔA 过小，可以延长反应时间 T（如：10min 或更长）再读取 A2，或增加样本量 V1（如增至 20μL，则试剂五相应减小），重新调整的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

2. 若 A 测定值大于 1.5，可缩减反应时间 T（如：1min 或更短）再读取 A2，或减少样本量 V1（如减至 5μL，则试剂五相应增加），重新调整的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

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 。



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(nmol/min /mg prot)=[(ΔA+0.0173)÷0.0838]÷(V1×Cpr)÷T=596.7×(ΔA+0.0173)÷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(nmol/min/g 鲜重)=[(ΔA+0.0173)÷0.0838]÷(W×V1÷V)÷T=596.7×(ΔA+0.0173)÷W

4、按细胞数量计算：

单位定义：每 10^4 个细胞每分钟使 1nmol NADP^+ 转换成 1nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

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

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。

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

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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 ($1\text{nmol}/\mu\text{L}$)：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. $\text{nmol}/\mu\text{L}$ 。
- 3 依据加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。