

腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（ADP-glucose pyrophosphorylase, AGP）活性测定试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

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/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水

试剂的组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体20mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1瓶，4℃保存；临用前加入9mL蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

试剂三：粉剂×1瓶，-20℃保存；临用前加入4mL蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

粗酶液制备

按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液），进行冰浴匀浆。10000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
- 2、试剂一置30℃保温10min以上。
- 3、在EP管中按顺序加入下列试剂

| 试剂名称（ μL ） | 测定管 |
|-----------------------|-----|
| 试剂一 | 50 |
| 试剂二 | 80 |
| 样本 | 10 |

混匀，30℃保温15 min，置沸水浴中1 min（盖紧，防止水分散失），冰浴迅速冷却后，4000g4℃离心5min，取上清液，在96孔板中依次加入下列试剂

| | |
|-----|----|
| 上清液 | 80 |
| 试剂一 | 85 |
| 试剂三 | 35 |

混匀后，立即于340 nm波长下记录初始吸光度A1和 2min后的吸光度A2，计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

AGP活性计算

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

1、按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟催化产生1nmol NADPH定义为一个酶活性单位。

$$\text{AGP (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times \text{稀释倍数}$$

$$= 2813 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

2、按照样本鲜重计算

单位的定义：每g组织每分钟催化产生1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{AGP (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times \text{稀释倍数}$$

$$= 2813 \times \Delta A \div W$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-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，0.01mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；稀释倍数：1.75；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量。

b.使用96孔板测定的计算公式如下：

1、按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟催化产生1nmol NADPH定义为一个酶活性单位。

$$\text{AGP (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times \text{稀释倍数}$$

$$= 5627 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

2、按照样本鲜重计算

单位的定义：每g组织每分钟催化产生1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{AGP (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times \text{稀释倍数}$$

$= 5627 \times \Delta A \div W$
V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.01 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；稀释倍数：1.75；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量。