

## 糖原磷酸化酶b (Glycogen phosphorylase b, GPb) 试剂盒说明书

微量法 100管/48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：

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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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。

测定原理：

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-磷酸葡萄糖脱氢酶进一步依次催化NADP还原生成NADPH，在340nm下测定NADPH上升速率，即可反映GP活性。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。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、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：100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体16 mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1瓶，-20℃保存；

试剂三：粉剂×1支，-20℃保存；

试剂四：粉剂×1支，-20℃保存；

试剂五：粉剂×1支，-20℃保存；

样本的前处理：

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。8000g 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. 工作液的配制：临用前将试剂二转移到试剂一中混合溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
3. 试剂三的配制：临用前在试剂三瓶中加入1mL蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
4. 试剂四的配制：临用前在试剂四瓶中加入1mL蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
5. 试剂五的配制：临用前在试剂五管中加入500 $\mu$ L蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
6. 将工作液、试剂三、试剂四和试剂五置于37℃预热5分钟；
7. 在微量石英比色皿或96孔板中加入10 $\mu$ L样本、10 $\mu$ L试剂三、10 $\mu$ L试剂四、10 $\mu$ L蒸馏水和160 $\mu$ L工作液，立即混匀，记录340nm处5min后的A1和10min后的吸光值A2，计算 $\Delta AGPa=A2-A1$ 。
8. 在微量石英比色皿或96孔板中加入10 $\mu$ L样本、10 $\mu$ L试剂三、10 $\mu$ L试剂四、10 $\mu$ L试剂五和160 $\mu$ L工作液，立即混匀，记录340nm处5min后的A3和10min后的吸光值A4，计算 $\Delta AGP=A4-A3$ 。

注意：由于每个样本需要同时测一个GP (GPa和GPb) 活性和一个GPa活性，因此本试剂盒100管测48个样本。

GPb活性计算：

a.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

单位定义: 每mg组织蛋白每分钟产生1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPb (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta\text{AGP} - \Delta\text{AGPa}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 643 \times (\Delta\text{AGP} - \Delta\text{AGPa}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义: 每g组织每分钟产生1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPb (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta\text{AGP} - \Delta\text{AGPa}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times (\Delta\text{AGP} - \Delta\text{AGPa}) \div W$$

V反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADPH摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol /cm; d: 比色皿光径, 1cm; 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, 5 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。

b.用96孔板测定的计算公式如下:

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义: 每mg组织蛋白每分钟产生1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPb (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta\text{AGP} - \Delta\text{AGPa}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1286 \times (\Delta\text{AGP} - \Delta\text{AGPa}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义: 每g组织每分钟产生1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPb (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta\text{AGP} - \Delta\text{AGPa}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times (\Delta\text{AGP} - \Delta\text{AGPa}) \div W$$

V反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADPH摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  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, 5 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。