

尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（UDP-glucose pyrophosphorylase, UGP）试剂盒说明书

微量法100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义

UDPG焦磷酸化酶是生物体糖原合成过程中的关键酶。在葡萄糖合成糖原前催化葡萄糖活化，将1-磷酸葡萄糖与UTP分子合成为UDP-葡萄糖（UDPG）。

测定原理

UGP可逆催化反应生成1磷酸葡萄糖，在磷酸葡萄糖变位酶和6-磷酸葡萄糖脱氢酶作用下将NADP转化为NADPH，340nm的吸光值增加速率反映了UGP活性。

自备实验用品及仪器

天平、低温离心机、研钵、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板

试剂组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体10mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1瓶，-20℃保存。临用前加2mL蒸馏水充分溶解；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2mL蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

试剂四：粉剂×1瓶，-20℃保存。临用前加2mL蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

试剂五：液体2mL×1瓶，4℃保存。

酶液提取

1. 组织：按照质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g，加入1mL提取液）加入提取液，冰浴匀浆后于4℃，10000g离心10min，取上清置冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后4℃，10000g离心10min，取上清置冰上待测。
3. 液体：直接检测。

测定操作

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 取微量石英比色皿/96孔板，依次加入100μL试剂一，20μL试剂二，20μL试剂三，20μL试剂四，20μL试剂五，20μL粗酶液，充分混匀，记录340nm处30s的吸光值A1和330s的吸光值A2， $\Delta A = A2 - A1$

计算公式

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

（1）按照样本蛋白浓度计算

酶活单位定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗1 nmol的NADP定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（2）按照样本质量计算

酶活单位定义：每克组织每分钟消耗1 nmol的NADP定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活单位定义：每104个细胞每分钟消耗1 nmol的NADP定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /104 cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 321.54 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(4) 按照液体体积计算

酶活单位定义：每毫升液体每分钟消耗1 nmol的NADP定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 321.54 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积，0.2mL； ϵ ：NADPH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.02mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g

b.使用96孔板测定的计算公式如下

(1) 按照样本蛋白浓度计算

酶活单位定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗1 nmol的NADP定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活单位定义：每克组织每分钟消耗1 nmol的NADP定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活单位定义：每104个细胞每分钟消耗1 nmol的NADP定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /104 cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 643.08 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(4) 按照液体体积计算

酶活单位定义：每毫升液体每分钟消耗1 nmol的NADP定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 643.08 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积，0.2mL； ϵ ：NADPH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ ；d：比色皿光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.02mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g