

ADPG Pyrophosphorylase Activity Assay Kit

ADPG 焦磷酸化酶活性检测试剂盒 微板法

| 产品编号 | 产品名称 | 规格 |
|---------|-----------------------|-----|
| BL1802B | ADPG 焦磷酸化酶活性检测试剂盒 微板法 | 96T |

产品简介:

ADPG 焦磷酸化酶(AGP, EC 2.7.7.27)是植物淀粉合成过程中起关键性调节作用的酶,催化 1-磷酸葡萄糖(G-1-P)与三磷酸腺苷(ATP)反应形成淀粉合成的直接前体腺苷二磷酸葡萄糖(ADPG),在植物中,主要存在于贮藏器官和叶片中。

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。

产品组成:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|-----------|---------|--|
| 提取液 | 120mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 粉末×1 支 | -20°C保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解,仍-20°C保存。 |
| 试剂二 | 粉末×1 支 | 4°C保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解。仍 4°C保存。 |
| 试剂三 | 13mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂四 | 粉末×1 支 | -20°C保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部,再加 2.1mL 蒸馏水溶解,仍-20°C保存。 |

使用方法:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

一、样本准备

1. 组织样本:

(a) 称取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.2g),加 1mL 提取液,进行冰浴匀浆;

(b) 12000rpm,4°C离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若样本颜色较深(如较深颜色的植物叶片),可引起起始值 A1 值较大如超过 1.5,可在样本制备过程中增加除色素步骤:取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.5g),加入 1mL 的 80%乙醇冰浴匀浆,12000rpm,4°C离心 10min,弃掉色素较深的上清液;以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液,混匀或再次冰浴匀浆,12000rpm,4°C离心 10min,取上清置冰上待测。

2. 液体样品:

澄清的液体样本直接检测;若浑浊则离心后取上清液检测。

二、样品测定

1. 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 340nm,设定温度为 30°C。

2. 所有试剂解冻至室温(25°C)。

3. 在 96 孔板中依次加入:



| 试剂名称 (μL) | 测定管 |
|--|-----|
| 样本 | 40 |
| 试剂一 | 10 |
| 试剂二 | 10 |
| 试剂三 | 120 |
| 轻轻混匀, 30°C 孵育 10min。 | |
| 试剂四 | 20 |
| 轻轻混匀, 反应开始, 30°C 条件下, 30S 后在 340nm 处读取吸光值 A1, 30min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。 | |

- 【注】:** 1. 若 ΔA 在零附近徘徊, 可延长反应时间 T 至 60min 后或更长读取 A2; 或加大样本上样量 V1 (如增至 80μL, 则试剂三相应减少, 保持总体积不变); 或增加样本取样质量 W; 则改变后的 T 和 V1 以及 W 需代入计算公式重新计算;
2. 若上升趋势不稳定, 可以每隔 10S 读取一次吸光值, 选取一段线性上升的时间段来参与计算, 相对应的 A1 和 A2 值也代入计算公式重新计算。
3. 若 ΔA 的值大于 0.4, 需缩减反应时间 T (如减至 10min 或更短), 或减少样本上样量 V1 (如减至 20μL, 则试剂三相应增加, 保持总体积不变); 则改变后反应时间 T 和 V1 需代入公式重新计算。

三、结果计算

1. 按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$AGP(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 53.6 \times \Delta A \div Cpr$$

2. 按照样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$AGP(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 53.6 \times \Delta A \div W$$

3. 按照液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$AGP(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 53.6 \times \Delta A$$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$ V---加入提取液体积, 1mL
V1---加入样本体积, 0.04mL V2---反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$
d---比色皿光径, 0.5cm W---样本质量, g
T---反应时间, 30min Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL

注意事项:

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期:

-20°C 保存六个月。

