

腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（AGP）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0435

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二 A	粉剂×2 瓶	-20°C保存
试剂二 B	液体 12mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	粉剂×2 瓶	2-8°C保存
试剂四	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂五	粉剂×1 支	-20°C保存

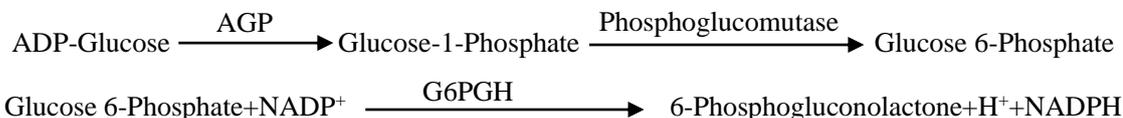
溶液的配制：

1. 试剂二：临用前取 1 瓶试剂二 A 加入 5mL 试剂二 B 充分溶解，用不完的试剂建议-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融；
2. 试剂三：临用前取 1 瓶加 3 mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂建议-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融；
3. 试剂四：临用前取 1 支加入 500 μL 蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融。
4. 试剂五：临用前加入 500 μL 蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂-20°C分装保存 8 周，避免反复冻融。

产品说明：

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。

AGP催化的逆向反应生成G-1-P，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。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板（UV板）、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

称取约 0.1g 组织加入 1mL 提取液，冰浴中匀浆。10000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。
2. 在 EP 管中按顺序加入下列试剂

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	40
试剂二	64
样本	8
混匀，30℃保温 15 min，置沸水浴中 1 min（盖紧，防止水分散失），冰浴迅速冷却后加入下列试剂（试剂一、试剂三置 37℃保温 10min 以上。）	
试剂一	120
试剂三	40
试剂四	8
试剂五	4

迅速混匀后在 340nm 波长下测定 10s 吸光值 A1 和 130s 吸光度 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

三、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组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生1nmol NADPH定义为一个酶活性单位。

$$\text{AGP活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div T \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) = 380.5 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（此法需要自行测定粗酶液蛋白质浓度）

2、按照样本质量计算

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟催化产生1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{AGP活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div T \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) = 380.5 \times \Delta A \div W$$

T: 反应时间, 15min; ϵ : NADPH消光系数, $6.22 \times 10^{-3} \text{ mL/nmol/cm}$; V反应: 反应总体积, 0.284mL; d: 石英比色皿光程, 1cm; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; V样本: 加入的样本体积, 0.008mL; V提取: 加入的提取液体积, 1mL; W: 样本质量, g。

b. 使用96孔UV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组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生1nmol NADPH定义为一个酶活性单位。

$$\text{AGP活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div T \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) = 634.1 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（此法需要自行测定粗酶液蛋白质浓度）

2、按照样本质量计算

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟催化产生1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{AGP活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div T \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) = 634.1 \times \Delta A \div W$$

T: 反应时间, 15min; ϵ : NADPH消光系数, $6.22 \times 10^{-3} \text{ mL/nmol/cm}$; V反应: 反应总体积, 0.284mL; d: 96孔板光程, 0.6cm; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; V样本: 加入的样本体积, 0.008mL; V提取: 加入的提取液体

积, 1mL; W: 样本质量, g。

注意事项:

- 1、如果一次性测定样本较多, 可以将试剂一、二按比例配成混合液1, 将试剂一、三、四和五按比例配成混合液2。
- 2、若测定数值较小, 可以加大样本量或者延长第二步反应时间。

实验实例:

- 1、取 0.1g 柳树叶片加入 1mL 提取液冰浴中匀浆。10000g , 4°C离心 10min, 取上清置冰上, 之后按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.5784 - 0.4855 = 0.0929$, 按样本质量计算酶活得:
AGP 活性 (U/g 质量) = $380.5 \times \Delta A \div W = 353.48$ U/g 质量。

参考文献:

[1] Baroja-Fernández E, Zandueta-Criado A, Rodríguez-López M, et al. Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphatase and ADPglucose pyrophosphorylase occur in the suspension-cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L)[J]. FEBS letters, 2000, 480(2-3): 277-282.

相关系列产品:

- BC0700/BC0705 淀粉含量检测试剂盒
- BC1850/BC1855 可溶性淀粉合成酶 (SSS) 活性检测试剂盒
- BC3290/BC3295 结合态淀粉合成酶 (GBSS) 活性检测试剂盒
- BC2670/BC2675 糖化酶活性检测试剂盒

