

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 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:

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。

组成:

产品名称	GCS008-100T/96S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 液体	10ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	-20°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	-20°C
试剂四: 粉剂	1 瓶	-20°C
试剂五: 液体	2ml	4°C
说明书	一份	

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

试剂三: 粉剂×1 瓶, -20°C保存。临用前加 2ml 蒸馏水充分溶解; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。

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

自备仪器和用品:

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

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

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



提取液，冰浴匀浆后于 4°C，10000g 离心 10min，取上清置冰上待测。

2. 细胞：按照细胞数量 (10^4 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°C，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 100 μ l 试剂一，20 μ l 试剂二，20 μ l 试剂三，20 μ l 试剂四，20 μ l 试剂五，20 μ l 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。

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

(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。

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

(3) 按照细胞数量计算

酶活单位定义：每 10^4 个细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{UGP (nmol/min /} 10^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 321.54 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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， $6.22 \times 10^3 \text{ L / mol / cm}$ ；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 10^4 个细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{UGP (nmol/min /} 10^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 643.08 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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。

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

V 反总：反应体系总体积，0.2ml； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；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

