

腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophosphorylase, AGP) 活性测定

试剂盒说明书

分光光度法

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:

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。

测定原理:

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。

组成:

产品名称	SA001-25T/24S	SA001-50T/48S	Storage
提取液: 液体	25ml	50ml	4°C
试剂一: 液体	20ml	40ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	1 瓶	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	1 瓶	-20°C
说明书	1 份		

SA001-25T/24S 试剂二临用前加入 9mL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;

SA001-25T/24S 试剂三临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;

SA001-50T/48S 试剂二临用前加入 18mL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;

SA001-50T/48S 试剂三临用前加入 10mL 蒸馏水充分溶解备用; 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:

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水

粗酶液制备:



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。10000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、试剂一置 30℃ 保温 10min 以上。
- 3、在 EP 管中按顺序加入下列试剂

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	200
试剂二	320
样本	40

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, 4000g 4℃ 离心 5min, 取上清液, 在 1mL 石英比色皿中依次加入下列试剂

上清液	400
试剂一	425
试剂三	175

混匀后, 立即于 340 nm 波长下记录初始吸光度 A1 和 2min 后的吸光度 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

AGP 活性计算:

- 1、按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{AGP (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times \text{稀释倍数}$$

$$= 2813 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

- 2、按照样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{AGP (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times \text{稀释倍数}$$

$$= 2813 \times \Delta A \div W$$

V 反总: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.04mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 2 min; 稀释倍数: 1.4; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量。

