

ADP-Glucose Pyrophosphorylase Activity Assay Kit

腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（AGP）活性测定试剂盒说明书

货号: BN72027 | 方法: 微板法 | 规格: 48 样

一、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。

二、测试盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体60mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	粉体mg×1支	-20℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再加 0.65mL蒸馏水溶解,可-20℃分装保存。
试剂二	粉体mg×1支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再加 0.65mL蒸馏水溶解。仍4℃保存。
试剂三	液体7mL×1瓶	4℃保存	
试剂四	粉体mg×1支	-20℃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℃保存。

【注】: 粉剂量在 mg 级别,使用前用手甩几次或者进行离心,打开直接加入要求的试剂即可。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（AGP）活性测定:

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!

1、样本制备:

① 组织样本:

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,12000rpm,4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】: 也可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

【注意】 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℃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℃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。

2、上机检测:

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

② 所有试剂解冻至室温(25℃),或可放在 25℃条件下水浴 15min 左右。

③ 在 96 孔板中按照下表依次加入:

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 在 340nm 处读取吸光值 A1, 30min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、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。

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

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。

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

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。

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

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

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---光径, 0.5cm;

T---反应时间, 30min;

W---样本质量, g ;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。