

## 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:BN72028| 方法: 可见分光法 | 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1.1mL蒸馏水溶解,仍-20℃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1.1mL蒸馏水溶解。仍4℃保存。     |
| 试剂三  | 液体32mL×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 2.1mL 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:

可见分光光度计、1ml 石英比色皿(光径 1cm)、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 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 340nm,设定温度为 30℃,蒸馏水调零。

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 1mL 石英比色皿(光径 1cm)中依次加入:

| 试剂名称 (μL)                                                                           | 测定管 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 样本                                                                                  | 100 |
| 试剂一                                                                                 | 20  |
| 试剂二                                                                                 | 20  |
| 试剂三                                                                                 | 540 |
| 轻轻混匀, 30°C 孵育 10min。                                                                |     |
| 试剂四                                                                                 | 40  |
| 轻轻混匀, 反应开始, 30°C 条件下, 1min 后在 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。

$$AGP(nmol/min/mg \text{ prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 38.6 \times \Delta A \div Cpr$$

### 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。

$$AGP(nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 38.6 \times \Delta A \div W$$

### 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。

$$AGP(nmol/min/mL) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 38.6 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---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, 0.1mL;

V2---反应体系总体积,  $7.2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;

d---比色皿光径, 1cm;

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。