

尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（UDP-glucose pyrophosphorylase, UGP）试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

UDPG 焦磷酸化酶（UGP, EC 2.7.7.9）是碳水化合物代谢的重要指标之一，广泛分布于自然界中，在微生物及动植物的许多组织中都有存在。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）。为各类碳水化合物包括蔗糖、葡聚糖、纤维素、半纤维素、果胶质、糖蛋白等的合成提供葡萄糖基。

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。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉体×1 支	-20℃ 保存	临用前加 1.1mL 试剂一溶解，仍-20℃ 保存。
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前加 5.4mL 去离子水溶解。
试剂四	粉体 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前加 5.4mL 去离子水溶解。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、天平、低温离心机、研钵、蒸馏水。

四、尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（UGP）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。

② 细胞样本：

取 500 万细胞加入 1mL 提取液；超声波破碎细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 1000~5000：1 的比例进行提取

③ 液体样品：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min，调节波长至 340nm，设定温度为 30℃。

② 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ μ L）	测定管
样本	10
试剂一	80
试剂二	10

试剂三	50
轻轻混匀, 30℃ 孵育 10min。	
试剂四	50
轻轻混匀, 反应开始, 1min 时在 340nm 处读取吸光值 A1, 5min 时读取 A2, $\Delta A=A2-A1$ 。	

【注】1. 若 ΔA 差值在零附近徘徊, 可以延长反应时间 20min 后读取 A2, 则相应的反应时间 T 则代入计算公式重新计算;

或者加大样本上样量 (如: 由 10 μ L 增加到 20 μ L, 则试剂一相应减少, 保持总体积 200 μ L 不变), 改变后的加样体积即 V1 代入计算公式重新计算;

或者由 0.1g 样本取样量增加到 0.2g, 加 1mL 的提取液研磨提取。

2. 若上升趋势不稳定, 可以每隔 10S 读取一次吸光值, 选取一段线性上升的时间段来参与计算, 相对应的 A1 和 A2 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按照样本蛋白浓度计算

酶活定义: 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。

$$\begin{aligned} \text{UGP (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 1607.8 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活定义: 每克组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{UGP (nmol/min /g 鲜重)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 1607.8 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活定义: 每 104 个细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{UGP (nmol/min /104 cell)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 3.2 \times \Delta A \end{aligned}$$

(4) 按照液体体积计算

酶活定义: 每毫升液体每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min /mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 1607.8 \times \Delta A$$

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

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.01mL;

V2---反应体系总体积, 2 $\times 10^4$ L;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

T---反应时间, 4min;

500---细胞总数, 500 万;

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。