

糖原磷酸化酶 b (GPb) 试剂盒说明书

(微板法 48 样)

一、产品简介:

糖原磷酸化酶 (Glycogen phosphorylase, GP, EC 2.4.1.1) 是糖原分解代谢的关键酶, 使糖原分子从非还原端逐个断开 α -1, 4-糖苷键移去葡萄糖基, 释放 1-磷酸葡萄糖, 直至临近糖原分子 α -1, 6-糖苷键分支点前 4 个葡萄糖基处。GP 分为有活性的糖原磷酸化酶 a (GP_a) 和无活性的糖原磷酸化酶 b (GP_b) 两种形式。GP_b 在一定浓度的腺苷酸 (5' -AMP) 存在下可被激活。

本试剂盒提供一种快速, 灵敏和简便的检测方法, GP 催化糖原和无机磷产生葡萄糖残基生成糖原和 1-磷酸葡萄糖, 磷酸葡萄糖变位酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶依次催化 NADP⁺还原成 NADPH, 接着与特异显色剂反应生成有色物质, 通过检测该有色物在 450nm 的增加速率, 进而计算出 GP 酶活性大小。添加一定浓度的腺苷酸 (5' -AMP) 时测定 GP (GP_a 和 GP_b) 活性, 未添加腺苷酸 (5' -AMP) 时测定 GP_a 活性, GP 活性减去 GP_a 活性得到 GP_b 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 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂三	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂四	液体 1mL×1 支	4℃ 保存	
试剂五	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂六	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用。
标准品	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

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。

四、糖原磷酸化酶 b (GPb) 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, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃ 离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取

② 细胞样本:

先收集细胞到离心管内, 离心后弃上清; 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); 4℃ 约 12,000rpm 离心 10min, 取上清作为待测样品。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 设置温度 30℃, 调节波长至 450nm。

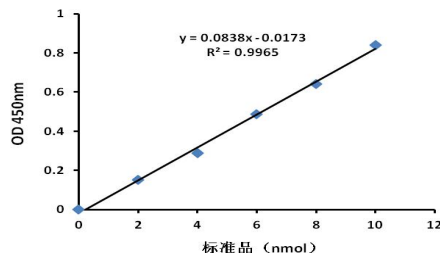
- ② 试剂放在 30°C水浴 5min;
 ③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	10	
试剂二	10	10
试剂三	10	10
试剂四	10	10
试剂五	140	150
混匀, 30°C条件下孵育 10min		
试剂六	10	10
混匀, 30°C条件下, 2min 时立即于 450nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定-A 对照 (每个样本需做一个样本自身对照)。		

- 【注】:** 1. 若 ΔA 过小, 可以延长反应时间 T (如: 10min 或更长) 再读取 A2, 或增加样本量 V1 (如增至 20μL, 则试剂五相应减小), 重新调整的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。
 2. 若 A 测定值大于 1.5, 可缩减反应时间 T (如: 1min 或更短) 再读取 A2, 或减少样本量 V1 (如减至 5μL, 则试剂五相应增加), 重新调整的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0838x - 0.0173$, x 是标准品摩尔质量: nmol, y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟使 1nmol NADP⁺转换成 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$GPb \text{ (nmol/min /mg prot)} = [(\Delta A + 0.0173) \div 0.0838] \div (V1 \times Cpr) \div T = 596.7 \times (\Delta A + 0.0173) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每分钟使 1nmol NADP⁺转换成 1nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

$$GPb \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0173) \div 0.0838] \div (W \times V1 \div V) \div T = 596.7 \times (\Delta A + 0.0173) \div W$$

4、按细胞数量计算:

单位定义: 每 10⁴ 个细胞每分钟使 1nmol NADP⁺转换成 1nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

$$GPb \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0173) \div 0.0838] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.19 \times (\Delta A + 0.0173)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.01 mL;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 2 min;

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。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (1nmol/μL): 向标准品 EP 管里面加入 0.6mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20°C保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/μL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。