

糖原磷酸化酶 b (Glycogen phosphorylase b, GPb) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

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:

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 (GPa) 和无活性的糖原磷酸化酶 b (GPb) 两种形式。GPb 在一定浓度的腺苷酸 (5' -AMP) 存在下可被激活。

测定原理:

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-磷酸葡萄糖脱氢酶进一步依次催化 NADP 还原生成 NADPH, 在 340nm 下测定 NADPH 上升速率, 即可反映 GP 活性。添加一定浓度的腺苷酸 (5' -AMP) 时测定 GP (GPa 和 GPb) 活性, 未添加腺苷酸 (5' -AMP) 时测定 GPa 活性, GP 活性-GPa 活性得到 GPb 活性。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 100mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 16 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存;

试剂三: 粉剂×1 支, -20℃ 保存;

试剂四: 粉剂×1 支, -20℃ 保存;

试剂五: 粉剂×1 支, -20℃ 保存;

样本的前处理:

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。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零;
- 2、工作液的配制: 临用前将试剂二转移到试剂一中混合溶解待用; 用不完的试剂分装后 -20℃ 保存, 禁止反复冻融。
- 3、试剂三的配制: 临用前在试剂三瓶中加入 1mL 蒸馏水充分溶解待用; 用不完的试剂分装后 -20℃ 保存, 禁止反复冻融。
- 4、试剂四的配制: 临用前在试剂四瓶中加入 1mL 蒸馏水充分溶解待用; 用不完的试剂分装后 -20℃ 保存, 禁止反复冻融。
- 5、试剂五的配制: 临用前在试剂五管中加入 500 μ L 蒸馏水充分溶解待用; 用不完的试剂分装后 -20℃ 保存, 禁止反复冻融。
- 6、将工作液、试剂三、试剂四和试剂五置于 37℃ 预热 5 分钟;
- 7、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μ L 样本、10 μ L 试剂三、10 μ L 试剂四、10 μ L 蒸馏水和 160 μ L 工作液, 立即混匀, 记录 340nm 处 5min 后的 A1 和 10min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta AGPa=A2-A1$ 。

8、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μ L 样本、10 μ L 试剂三、10 μ L 试剂四、10 μ L 试剂五和 160 μ L 工作液，立即混匀，记录 340nm 处 5min 后的 A3 和 10min 后的吸光值 A4，计算 $\Delta AGP=A4-A3$ 。

注意：由于每个样本需要同时测一个 GP（GPa 和 GPb）活性和一个 GPa 活性，因此本试剂盒 100 管测 48 个样本。

GPb 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$GPb \text{ (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta AGP - \Delta AGPa) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T = 643 \times (\Delta AGP - \Delta AGPa) \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$GPb \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta AGP - \Delta AGPa) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times (\Delta AGP - \Delta AGPa) \div W$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} 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，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下：

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$GPb \text{ (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta AGP - \Delta AGPa) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T = 1286 \times (\Delta AGP - \Delta AGPa) \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$GPb \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta AGP - \Delta AGPa) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times (\Delta AGP - \Delta AGPa) \div W$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。