

## 糖原磷酸化酶 a (Glycogen phosphorylase a, GP<sub>a</sub>) 试剂盒说明书

分光光度法 50 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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<sub>a</sub>) 和无活性的糖原磷酸化酶 b (GP<sub>b</sub>) 两种形式。糖原的分解主要在 GP<sub>a</sub> 的催化下进行。

### 测定原理:

未添加激活剂时, GP<sub>a</sub> 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<sub>a</sub> 活性。

### 需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

### 试剂的组成和配制:

提取液: 60mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 40 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;

### 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 2.5mL 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 2.5mL 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、将工作液、试剂三和试剂四置于 37℃ 预热 5 分钟;
- 6、在 1mL 石英比色皿中加入 50 $\mu$ L 样本、50 $\mu$ L 试剂三、50 $\mu$ L 试剂四、50 $\mu$ L 蒸馏水和 800 $\mu$ 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  $\Delta A = A2 - A1$ 。

**GPa 活性计算:**

(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。

$$\text{GPa (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

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

V 反总: 反应体系总体积,  $1 \times 10^{-3}$  L;  $\epsilon$ : NADPH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.05 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。