

UDPG 焦磷酸化酶 (UGP) 活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: AC10587

规格: 100T/96S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂三	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂四	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂五	液体 2.5 mL×1 瓶	4°C保存
试剂六	液体 5 mL×1 瓶	4°C保存

溶液的配制:

1. 试剂一: 临用前加 15 mL 蒸馏水充分溶解; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, -20°C保存 2 周。
2. 试剂二: 临用前加 2.5 mL 蒸馏水充分溶解; 用不完的试剂分装后 4°C保存, 禁止反复冻融, 4°C保存 1 周。
3. 试剂三: 临用前加 1.4 mL 蒸馏水充分溶解; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, -20°C保存 2 周。
4. 试剂四: 临用前每支加 1 mL 蒸馏水充分溶解; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, -20°C保存 2 周。
5. 工作液的配制: 将试剂一: 试剂二: 试剂三: 试剂四: 试剂五: 试剂六按体积比=600: 100: 20: 40: 100: 250 混合, 现用现配。

产品说明:

尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-glucose pyrophosphorylase, UGP, EC 2.7.7.9) 在自然界广泛分布。在葡萄糖合成糖原前催化葡萄糖活化, 将1-磷酸葡萄糖与UTP分子合成为UDP-葡萄糖 (UDPG), UDPG是高等植物和动物中主要活化酶的形式, 作为葡萄糖基供体参与糖原、蔗糖、纤维素等的合成代谢。

UGP可逆的催化生成1-磷酸葡萄糖, 其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, UGP活性可以用340nm的吸光值的变化来反应。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:**一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)**

1. 组织: 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, 然后 10000g, 4°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

2. 细胞：按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）然后 10000g，4°C，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接检测。

二、测定步骤

1、紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。

2、操作表：

试剂名称	空白管	测定管
样本（ μL ）		20
工作液（ μL ）	180	180
蒸馏水（ μL ）	20	-

在微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入上述试剂，充分混匀后于340nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于37°C（哺乳动物）水浴锅或者培养箱5min（酶标仪有控温功能的可将温度调至37°C），拿出迅速擦干测定310s时的吸光值A2，计算 ΔA 测定管=A2测定-A1测定， ΔA 空白管=A2空白-A1空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管（空白管只需做1-2次）。

三、UGP 酶活计算

1、按微量玻璃比色皿进行计算：

（1）按照样本蛋白浓度计算

酶活单位定义：每毫克组织蛋白每分钟产生1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（2）按照样本质量计算

酶活单位定义：每克组织每分钟产生1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (U/g 质量)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

（3）按照细胞数量计算

酶活单位定义：每 10^4 个细胞每分钟产生1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

（4）按照液体体积计算

酶活单位定义：每毫升液体每分钟产生1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (U/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 321.54 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， $1 \times 10^{-3}\text{L}$ ； ϵ ：NADPH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3\text{L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.1mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500万； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

2、按96孔UV板进行计算：

将计算公式中的d-1cm修改为d-0.6cm进行计算即可。

注意事项：

- 1、空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过0.01。
- 2、A大于0.6或者A2测定大于1.5时，建议将样本稀释后再进行测定。当 ΔA 小于0.01时，可以延长反应时间（5min或10min）来测定。