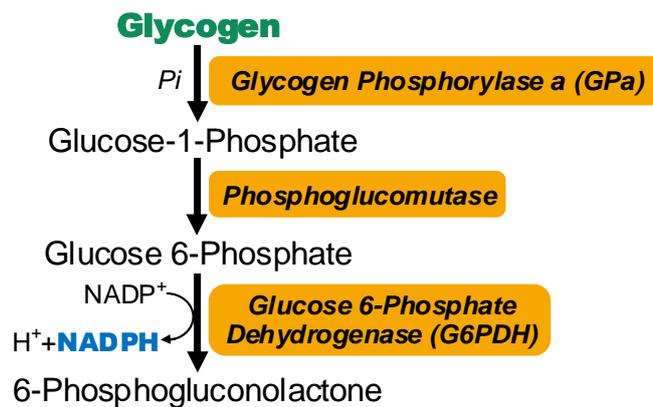




糖原磷酸化酶 a (GP_a) 活性检测试剂盒

Glycogen Phosphorylase a (GP_a) Activity Assay Kit



糖原磷酸化酶 a (GPa) 活性检测试剂盒

Glycogen Phosphorylase a (GPa) Activity Assay Kit

一、产品描述

糖原磷酸化酶 (GP) 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, 糖原磷酸化酶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, 糖原的分解主要在 GPa 的催化下进行。

糖原磷酸化酶 a 催化糖原和无机磷产生葡萄糖残基和 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, NADPH 在 340 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值的变化率即可表征糖原磷酸化酶 a 的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 50 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×1 支	4°C 保存	使用前加入 1.25 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月, 避免反复冻融)
试剂三	粉剂×1 支	4°C 保存	使用前加入 1.25 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月, 避免反复冻融)
试剂四	粉剂×1 支	-20°C 保存	使用前加入 1.25 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月, 避免反复冻融)
试剂五	粉剂×3 支	-20°C 保存	使用前每支加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月, 避免反复冻融)
试剂六	粉剂×3 支	-20°C 保存	使用前每支加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月, 避免反复冻融)
检测工作液的制备 (现用现配): 使用前根据使用量按照试剂一: 试剂二: 试剂三: 试剂四: 蒸馏水=74:2:2:2:5 的体积比配制, 充分混匀即为检测工作液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 紫外分光光度计、1 mL 石英比色皿 (光径 10 mm)、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量(10^4 个)：提取液体积(mL)为（500-1000）：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1 mL提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率200 W，超声3 s，间隔10 s，重复30次），4°C 8000 g离心10 min，取上清置于冰上待测。

②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0.1 g组织，加入1 mL提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 8000 g离心10 min，取上清置于冰上待测。

③血液（浆）、培养液等液体样本：直接测定或适当稀释后再进行测定。

2.测定步骤

①紫外分光光度计预热30 min以上，调节波长至340 nm，蒸馏水调零。

②试验前将检测工作液37°C预热5 min以上。

③在1 mL石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)
粗酶液	50
试剂五	50
试剂六	50
检测工作液	850

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定10 s时340 nm处吸光值，记为A1；②37°C准确反应10 min，测定10 min10 s时340 nm处吸光值，记为A2；③计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

3.糖原磷酸化酶 a (GPa) 活性计算

①按组织蛋白浓度计算

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

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

②按组织样本质量计算

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

$$\text{GPa (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{321.54 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPa (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{321.54 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

②按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.05 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：1 mL 石英比色皿光径，1 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，10 min； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

四、注意事项

- ①若 ΔA 大于 0.8，建议将粗酶液适当稀释后再进行测定；若 ΔA 小于 0.02，建议适当延长酶促反应时间（37°C 反应时间）后再进行测定，计算时相应修改；
- ②准确在相应时间点完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；
- ③为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China
TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

