

糖原磷酸化酶 b (GPb)活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC10584

规格：50T/24S

产品内容：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 30mL×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
试剂三	粉剂×1 支	4°C保存
试剂四	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂五	粉剂×3 支	-20°C保存
试剂六	粉剂×3 支	-20°C保存
试剂七	粉剂×1 瓶	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 1.25 mL 蒸馏水，充分混匀；4°C保存 2 个月；
- 2、试剂三：临用前加入 1.25 mL 蒸馏水，充分混匀；可分装后-20°C保存 4 周，避免反复冻融；
- 3、试剂四：临用前加入 1.25mL 蒸馏水，充分混匀；可分装后-20°C保存 4 周，避免反复冻融；
- 4、试剂五：临用前每支加入 1 mL 蒸馏水，充分混匀；可分装后-20°C保存 4 周，避免反复冻融；
- 5、试剂六：临用前每支加入 1 mL 蒸馏水，充分混匀；可分装后-20°C保存 4 周，避免反复冻融；
- 6、试剂七：临用前加入 4 mL 蒸馏水，充分混匀后-20 分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 7、工作液的配制：临用前根据实验所需用量，按照试剂一：试剂二：试剂三：试剂四 =740μL: 20μL: 20μL: 20μL（1T 的量）的比例，充分混匀，现用现配。

产品说明：

糖原磷酸化酶是糖原分解代谢中的关键酶，催化糖原的磷酸化反应。该酶分为有活性的糖原磷酸化酶 a（Glycogen phosphorylase a, GP_a）和无活性的糖原磷酸化酶 b（Glycogen phosphorylase b, GP_b）两种形式。糖原的分解主要在糖原磷酸化酶 a 的催化下进行。未添加激活剂时，糖原磷酸化酶 a 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，即可反映糖原磷酸化酶 a 活性。添加激活剂测定 GP（GP_a 和 GP_b）总活性，未添加激活剂时测定 GP_a 活性，GP 活性-GP_a 活性得到 GP_b 活性。

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、低温离心机、恒温培养箱/水浴锅、电子天平、可调式移液器、研钵/匀浆器、1 mL 石英比色皿、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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆，然后 8000 g，4°C，离心 10 min，取上清置于冰上待测。

2、血清（浆）：直接检测。若有浑浊可以离心后取上清进行测定。

3、细菌或者细胞：先收集细胞或细菌样本到离心管内，弃上清，按照每 500 万细胞或细菌加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）。8000g，4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

二、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、工作液置于 37°C 预热 5min。

3、GPa 活性:在石英比色皿中依次加入 50 μL 样本、50 μL 试剂五、50 μL 试剂六、**50 μL 蒸馏水**、800 μL 工作液，立即混匀并计时，记录 340 nm 下 10s 时吸光值 A1 和 10min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A_{GPa}=A_2-A_1$ 。

4、GP 活性:在石英比色皿中依次加入 50 μL 样本、50 μL 试剂五、50 μL 试剂六、**50 μL 试剂七**、800 μL 工作液，立即混匀并计时，记录 340 nm 下 10s 时吸光值 A1 和 10min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A_{GP}=A_4-A_3$ 。

三、糖原磷酸化酶 b (GPb)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。

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

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。

$$GPb \text{ (U/g 鲜重)} = [(\Delta A_{GP} - \Delta A_{GPa}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.54 \times (\Delta A_{GP} - \Delta A_{GPa}) \div W$$

3. 按样本体积计算

单位定义：每 mL 液体每分钟产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位

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

4. 按细胞数量计算

单位定义：每 1 万个细胞每分钟产生 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$GPa \text{ (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A_{GP} - \Delta A_{GPa}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 321.54 \times (\Delta A_{GP} - \Delta A_{GPa}) \div \text{细胞数量}$$

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: 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, 10 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 细胞数量: 以万计; 10^9 : $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

注意事项:

1、如果测定吸光值 $\Delta A > 0.8$ ，建议稀释样本后再测定，计算公式中乘以稀释倍数；如果测定吸光值较低或接近空白 OD 值，建议增加反应中的样本体积或者样本质量后再进行测定。

实验实例:

1、称取 0.1 g 兔子肝脏组织, 加入 1 mL 提取液, 冰浴匀浆, 8000 g, 4°C条件下离心 10 min; 取上清置于冰上待测。按照测定步骤操作, 用石英比色皿比色后计算 $\Delta A_{GPa}=A_2-A_1=0.414-0.318=0.096$, $\Delta A_{GP}=A_4-A_3=0.434-0.320=0.114$,按公式计算活性:

$$GPb \text{ (U/g 鲜重)} = 321.54 \times (\Delta A_{GP} - \Delta A_{GPa}) \div W = 321.54 \times (0.114 - 0.096) \div 0.1 = 57.87 \text{U/g 鲜重}$$