

糖原磷酸化酶a (GP_a) 检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1382

产品规格: 100管/96样

产品简介:

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 (GP_a) 和无活性的糖原磷酸化酶 b (GP_b) 两种形式。糖原的分解主要在GP_a的催化下进行。

未添加激活剂时, GP_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GP_a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。

试验中所需的仪器和试剂:

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。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体16mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	粉剂×1支	-20℃
试剂四	粉剂×1支	-20℃

操作步骤 (仅供参考):

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)

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, 取上清液待测。

二、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. 将工作液、试剂三和试剂四置于 37℃ 预热 5 分钟;
6. 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、50 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 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

三、GP_a 酶活计算



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

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。

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

(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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 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, 0.01mL; 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。

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。

$$\text{GPa (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 61286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(3) 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。

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

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, 0.05cm; V 样: 加入样本体积, 0.01mL; 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com