

尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-glucose pyrophosphorylase, UGP) 试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

UDPG 焦磷酸化酶是生物体糖原合成过程中的关键酶。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)。

测定原理：

UGP 可逆催化反应生成 1 磷酸葡萄糖，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，340nm 的吸光值增加速率反映了 UGP 活性。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、研钵、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存。临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存。临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂四：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存。临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂五：液体 2mL×1 瓶，4℃ 保存。

酶液提取：

1. 组织：按照质量 (g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液）加入提取液，冰浴匀浆后于 4℃，10000g 离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量 (10⁴ 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），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 4℃，10000g 离心 10min，取上清置冰上待测。
3. 液体：直接检测。

测定操作:

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 取微量石英比色皿/96 孔板, 依次加入 100μL 试剂一, 20μL 试剂二, 20μL 试剂三, 20μL 试剂四, 20μL 试剂五, 20μL 粗酶液, 充分混匀, 记录 340nm 处 30s 的吸光值 A1 和 330s 的吸光值 A2, $\Delta A=A2-A1$

计算公式:
a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min / mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活单位定义: 每克组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min / g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

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

$$\begin{aligned} \text{UGP (nmol/min / } 10^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 321.54 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按照液体体积计算

酶活单位定义: 每毫升液体每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min / mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 321.54 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL; 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, 0.02mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 5 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

(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消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min / mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活单位定义: 每克组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min / g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643.08 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

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

$$\begin{aligned} \text{UGP (nmol/min / } 10^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 643.08 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按照液体体积计算

酶活单位定义: 每毫升液体每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min / mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 643.08 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L / mol / cm}$; d: 比色皿光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.02mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 5 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g