

## 糖原磷酸化酶 a (GP<sub>a</sub>) 检测试剂盒 (分光光度法)

**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：

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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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<sub>a</sub>) 和无活性的糖原磷酸化酶 b (GP<sub>b</sub>) 两种形式。糖原的分解主要在 GP<sub>a</sub> 的催化下进行。

### 测定原理：

未添加激活剂时，GP<sub>a</sub> 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<sub>a</sub> 活性。

### 试剂组成和配制：

试剂一：液体 40 mL×1 瓶， 4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶， -20℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 支， -20℃ 保存；

试剂四：粉剂×1 支， -20℃ 保存；

### 样本的前处理：

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，置冰上待测。

### 测定步骤：

- 1、分光光度计预热 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 2.5mL 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 2.5mL 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 1mL 石英比色皿中加入 50 $\mu$ L 样本、50 $\mu$ L 试剂三、50 $\mu$ L 试剂四、50 $\mu$ L 蒸馏水和 800 $\mu$ L 工作液，立即混匀，记录 340nm 处 5min 后的 A<sub>1</sub> 和 10min 后的吸光值 A<sub>2</sub>，计算  $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

## GPa 活性计算:

### 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。

$$\text{GPa (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ = 643 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### (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。

$$\text{GPa (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 643 \times \Delta A \div W$$

V 反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;

$\epsilon$ : NADPH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm;

d: 比色皿光径, 1cm;

V 样: 加入样本体积, 0.01 mL;

V 样总: 加入提取液体积, 1 mL;

T: 反应时间, 5 min;

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。

$$\text{GPa (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ = 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### (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。

$$\text{GPa (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 1286 \times \Delta A \div W$$

V 反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;

$\epsilon$ : NADPH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm;

d: 96 孔板光径, 0.5cm;

V 样: 加入样本体积, 0.01 mL;

V 样总: 加入提取液体积, 1 mL;

T: 反应时间, 5 min;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

W: 样本质量, g。