

## 尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（UGP）检测试剂盒（微量法）

**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：

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。

### 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：

- 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。
- 细胞：**按照细胞数量（ $10^4$  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。
- 液体：**直接检测。

### 测定步骤：

- 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 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。

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

(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。

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

(3) 按照细胞数量计算

酶活单位定义: 每 10<sup>4</sup> 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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL;

$\epsilon$ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10<sup>3</sup> 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。

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

(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。

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

(3) 按照细胞数量计算

酶活单位定义: 每 10<sup>4</sup> 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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL;

$\epsilon$ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10<sup>3</sup> 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