

糖原磷酸化酶 b (GPb) 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：

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 (GPa) 和无活性的糖原磷酸化酶 b (GPb) 两种形式。GPb 在一定浓度的腺苷酸 (5' -AMP) 存在下可被激活。

测定原理：

GP 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 活性。添加一定浓度的腺苷酸 (5' -AMP) 时测定 GP (GPa 和 GPb) 活性，未添加腺苷酸 (5' -AMP) 时测定 GPa 活性，GP 活性 - GPa 活性得到 GPb 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 16 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；

试剂五：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、试剂五的配制：临用前在试剂五管中加入 500 μ L 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。

- 6、将工作液、试剂三、试剂四和试剂五置于 37°C 预热 5 分钟；
- 7、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、10 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 $\Delta AGPa=A2-A1$ 。
- 8、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、10 μ L 试剂五和 160 μ L 工作液，立即混匀，记录 340nm 处 5min 后的 A3 和 10min 后的吸光值 A4，计算 $\Delta AGP=A4-A3$ 。

注意：由于每个样本需要同时测一个 GP (GPa 和 GPb) 活性和一个 GPa 活性，因此本试剂盒 100 管测 48 个样本。

GPb 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。

$$\begin{aligned} \text{GPb (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta AGP - \Delta AGPa) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 643 \times (\Delta AGP - \Delta AGPa) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{GPb (nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta AGP - \Delta AGPa) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 643 \times (\Delta AGP - \Delta AGPa) \div W \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$ L；

ϵ ：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。

$$\begin{aligned} \text{GPb (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta AGP - \Delta AGPa) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 1286 \times (\Delta AGP - \Delta AGPa) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{GPb (nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta AGP - \Delta AGPa) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1286 \times (\Delta AGP - \Delta AGPa) \div W \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$ L；

ϵ ：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。