

尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UGP) 试剂盒说明书

(货号: BP10289F 紫外法 48 样 有效期: 3 个月)

一、产品简介:

UDPG 焦磷酸化酶 (UGP, EC 2.7.7.9) 是碳水化合物代谢的重要指标之一, 广泛分布于自然界中, 在微生物及动植物的许多组织中都有存在。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)。为各类碳水化合物包括蔗糖、葡聚糖、纤维素、半纤维素、果胶质、糖蛋白等的合成提供葡萄糖基。

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。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体60mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体30mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	粉体1瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 临用前加1.1mL试剂一溶解, 仍-20℃保存。
试剂三	粉体1瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入5.5mL去离子水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	粉体1瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 5.5mL 去离子水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、所需的仪器和用品:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.3g), 加 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 也可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细胞样本:

取 500 万细胞加入 1mL 提取液; 超声波破碎细胞(冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细胞数量(10^4 个): 提取液体积(mL)为 1000~5000: 1 的比例进行提取

③ 液体样品: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min, 调节波长至 340nm, 设定温度为 30℃, 蒸馏水调零。

② 在 1mL 石英比色皿中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	460
试剂二	20
试剂三	100
轻轻混匀，30℃孵育 10min。	
试剂四	100
轻轻混匀，反应开始，1min 时在 340nm 处读取吸光值 A1， 5min 时读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【注】1. 若 ΔA 差值在零附近徘徊，可以延长反应时间 20min 后读取 A2，则相应的反应时间 T 则代入计算公式重新计算；
或者加大样本上样量（如：由 40μL 增加到 80μL，则试剂一相应减少，保持总体积不变），改变后的加样体积即 V1 代入计算公式重新计算；
或者由 0.1g 样本取样量增加到 0.2g，加 1mL 的提取液研磨提取。
2. 若上升趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性上升的时间段来参与计算，相对应的 A1 和 A2 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本蛋白浓度计算

酶活定义：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。

$$\text{UGP (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ = 723.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

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

$$\text{UGP (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 723.5 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活定义：每 104 个细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADP 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UGP (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ = 1.45 \times \Delta A$$

(4) 按照液体体积计算

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

$$\text{UGP (nmol/min/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 723.5 \times \Delta A$$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；
V1---加入样本体积，0.04mL；
d---比色皿光径，1cm；
500---细胞总数，500 万；
Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

V---加入提取液体积，1mL；
V2---反应体系总体积， $7.2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；
T---反应时间，4min；
W---样本质量，g；