（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K856-M

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(440-460 nm)

Elabscience®腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(AGP)比色法测试盒

Adenosine Diphosphate Glucose Prophosphorylase(AGP) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测植物组织样本中的腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(AGP)的酶活。

检测原理

腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(AGP)催化底物生成中间产物，中间产物在酶催化后产生显色物质，该物质在 450 nm 左右检测有最大吸收峰，通过 450 nm 处 OD 值增加大小可计算该酶活。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用考马斯亮蓝法(货号：E-BC-K168-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	20 mL×1 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酶试剂 (Enzymatic Reagent)	1.56 mL×1 支	-20ºC 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 A (Substrate A)	粉剂×1 支	-20ºC 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 B (Substrate B)	2.5 mL×1 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	促进剂 A (Accelerant A)	2.5 mL×1 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 (Chromogenic Agent)	2.5 mL×1 瓶	-20ºC 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	促进剂 B (Accelerant B)	2.5 mL×1 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	0.5 mmol/L 标准品溶液 (0.5 mmol/L Standard Solution)	3.3 mL×1 瓶	-20ºC 保存 6 个月
	96 孔酶标板	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(440-460 nm，最佳检测波长 450 nm)、涡旋混匀仪。

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三加入0.6 mL双蒸水，溶解混匀，未使用完的试剂可在-20°C保存一个月。

③ 测定工作液的配制：

将试剂一：试剂二：试剂三工作液：试剂五：试剂七按120：12：5：20：20体积比混匀，2-8ºC可避光保存1周。

④ 显色剂工作液的配制：

将试剂四：试剂六按1：1体积比混匀，现配现用。

⑤ 对照工作液的配制：

将试剂一：试剂五：试剂七按7：1：1体积比混匀，2-8ºC可避光保存1周。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	**0**	**0.1**	**0.15**	**0.2**	**0.3**	**0.35**	**0.4**	**0.5**
0.5 mmol/L 标准品(μL)	0	20	60	80	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	180	140	120	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量(g)：生理盐水(0.9%　NaCl)体积(mL)= 1：9的比例匀浆，4°C，10000 × g离心10 min，取上清待测，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.5-81.59 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%玉米组织	不稀释	10%芦笋组织	不稀释
10%绿萝组织	不稀释	10%大麦组织	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

操作步骤

① 测定孔/对照孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液，分别加入相应的酶标孔中。

② 向步骤①中测定孔、标准孔加入 140 μL 测定工作液，对照孔加入 160 μL 对照工作液。

③ 向步骤②中测定孔、标准孔加入 40 μL 显色剂工作液。

④ 向步骤③中对照孔加入 20 μL 试剂六。

⑤ 振板 5 s，37°C 避光静置 5 min 后酶标仪于 450 nm 波长下检测各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	**对照孔**	**测定孔**
不同浓度标准品(μL)	20	--	--
待测样本(μL)	--	20	20
测定工作液(μL)	140	--	140
对照工作液(μL)	--	160	--
显色剂工作液(μL)	40	--	40
试剂六(μL)		20	
振板 5 s，37°C 避光静置 5 min 后酶标仪于 450 nm 波长下检测各孔 OD 值。			

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用考马斯亮蓝法(货号：E-BC-K168-M)。

结果计算

标准品拟合曲线：$y = ax + b$

组织样本中腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 AGP 酶活计算公式：

定义：37°C 条件下，每克组织蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{AGP 酶活 (U/gprot)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \times f \div C_{pr} \times 1000$$

注解：

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔA_{450}：样本的绝对 OD 值（$\Delta A_{450} = A_{测定} - A_{对照}$）

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

T：反应时间，5 min

1000：1 mmol/L=1000 μmol/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

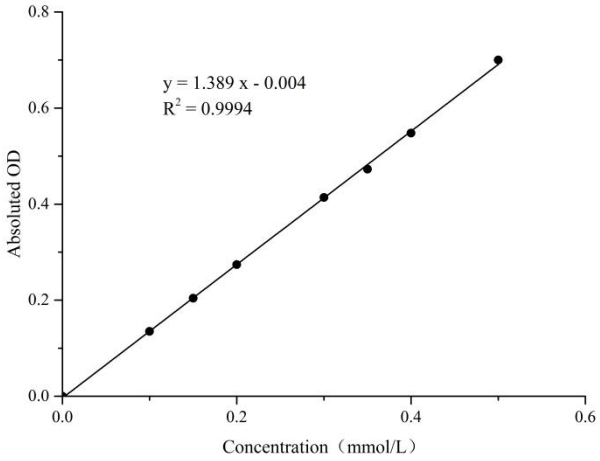
检测范围	0.5-81.59 U/L	**批间差**	5.5-10 %
灵敏度	0.5 U/L	**批内差**	3.0-4.2 %
回收率	98-102 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.1	0.15	0.2	0.3	0.35	0.4	0.5
OD 值	0.083	0.212	0.284	0.353	0.494	0.562	0.629	0.783
	0.078	0.218	0.285	0.355	0.494	0.545	0.627	0.778
平均 OD 值	0.081	0.215	0.285	0.354	0.494	0.554	0.628	0.781
绝对 OD 值	0.000	0.135	0.204	0.274	0.414	0.473	0.548	0.700

② 绘制标曲(如下图)：



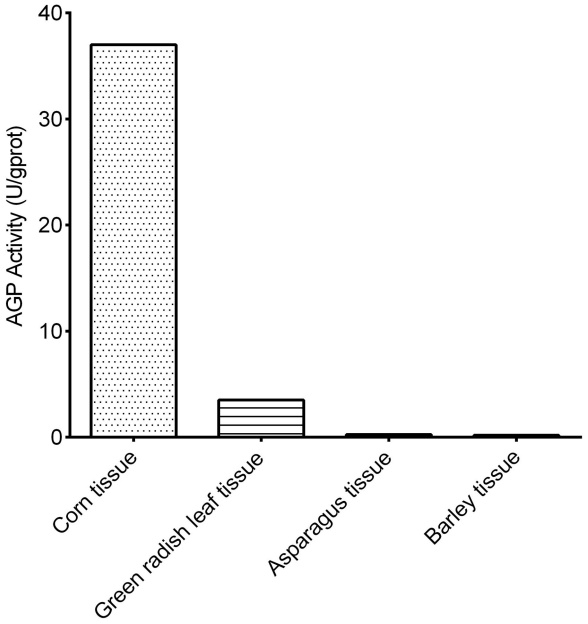
附录2 实例分析

例如检测玉米组织(数据仅供参考)：

将处理好的的10%玉米组织匀浆取20 μL，按操作表操作，结果如下：标准曲线：y = 1.389 x - 0.004，对照孔平均OD值为0.086，测定孔平均OD值为0.218，ΔA_{450} = 0.218 - 0.086 = 0.132，测定出10%玉米组织匀浆的蛋白浓度为0.52 gprot/L，计算结果为：

$$\text{AGP活力(U/gprot)} = (0.132 + 0.004) \div 1.389 \div 5 \div 0.52 \times 1000 = 37.66 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作，测定玉米组织上清液(10%组织匀浆蛋白浓度0.52 gprot/L，加样量20 μL)、绿萝叶组织上清液(10%组织匀浆蛋白浓度0.14 gprot/L，加样量20 μL)、芦笋组织上清液(10%组织匀浆蛋白浓度0.77 gprot/L，加样量为20 μL)、大麦组织上清液(10%组织匀浆蛋白1.24 gprot/L，加样量为20 μL)中的AGP活力(如下图)：



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。