

(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-K857-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(440-460 nm)

Elabscience[®]尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(UGP)

比色法测试盒

Uridine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase (UGP)

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动植物组织样本中的尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(UGP)的酶活。

检测原理

尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(UGP)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),UDPG是高等植物和动物中主要活化酶的形式,作为葡萄糖基供体参与糖原、蔗糖、纤维素等的合成代谢。

尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(UGP)催化样本中的1-磷酸葡萄糖合成为UDP-葡萄糖,UDP-葡萄糖经过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。

本试剂盒检测动植物组织样本时,需测定总蛋白浓度,动物组织样本推荐使用BCA法。(货号:E-BC-K318-M);植物组织样本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) | 提取液 (Extraction Solution) | 50 mL×1 瓶 | -20°C 保存 6 个月 |
| 试剂二 (Reagent 2) | 缓冲液 (Buffer Solution) | 20 mL×1 瓶 | -20°C 保存 6 个月 |
| 试剂三 (Reagent 3) | 酶试剂 (Enzymatic Reagent) | 1.2 mL×2 支 | -20°C 避光 保存 6 个月 |
| 试剂四 (Reagent 4) | 底物 A (Substrate A) | 粉剂×1 支 | -20°C 避光 保存 6 个月 |
| 试剂五 (Reagent 5) | 底物 B (Substrate B) | 1.5 mL×1 支 | -20°C 避光 保存 6 个月 |
| 试剂六 (Reagent 6) | 促进剂 (Accelerant) | 1.5 mL×1 支 | -20°C 避光 保存 6 个月 |

| | | | |
|--------------------|---|------------|---------------------|
| 试剂七 (Reagent 7) | 显色剂 (Chromogenic Agent) | 2.5 mL×1 瓶 | -20°C 避光 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 | -20°C 避光 保存 6 个月 |
| | 96 孔酶标板 | 1 板 | |
| | 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。

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂四工作液的配制：

取一支试剂四加入0.8 mL双蒸水，溶解混匀，未使用完的试剂可在-20 °C保存4周。

③ 测定工作液的配制：

将试剂二：试剂三：试剂四工作液：试剂五：试剂六按12：3：1：2：2体积比混匀，未使用完的工作液可在2-8°C避光保存1周。

④ 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 | 0.10 | 0.15 | 0.20 | 0.30 | 0.35 | 0.4 | 0.50 |
| 0.5 mmol/L 标准品(μL) | 0 | 40 | 60 | 80 | 120 | 140 | 160 | 200 |
| 双蒸水(μL) | 200 | 160 | 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):试剂一体积(mL)=1:9的比例匀浆,4℃,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:0.5-70.0 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 | 180-200 | 10%玉米皮组织 | 35-45 |
| 10%土豆组织 | 30-40 | 10%绿萝组织 | 不稀释 |
| 10%红薯组织 | 100-120 | 10%大鼠肝组织 | 100-120 |
| 10%大鼠肾组织 | 不稀释 | | |

注:稀释液为试剂一。

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 120 μL 测定工作液，对照孔加入 120 μL 试剂二；
- ③ 向步骤②中测定孔、标准孔、对照孔中加入 20 μL 试剂七；
- ④ 振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 min 后酶标仪于 450 nm 波长下检测各孔 OD 值。

操作表

| | 测定孔 | 对照孔 | 标准孔 |
|--|-----|-----|-----|
| 待测样本(μL) | 20 | 20 | -- |
| 不同浓度标准品(μL) | -- | -- | 20 |
| 测定工作液(μL) | 120 | -- | 120 |
| 试剂二(μL) | -- | 120 | -- |
| 试剂七(μL) | 20 | 20 | 20 |
| 振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 min 后酶标仪于 450 nm 波长下检测各孔 OD 值。 | | | |

本试剂盒检测动物组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。
(货号：E-BC-K318-M)；检测植物组织样本时，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： $y = ax + b$

组织样本中尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（UGP）酶活计算公式：

定义：37℃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。

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

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 ($\Delta A_{450} = OD_{\text{测定}} - OD_{\text{对照}}$)

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

1000: 1 mmol/L = 1000 μmol/L

T: 反应时间, 5 min

附录1 关键数据

1. 技术参数

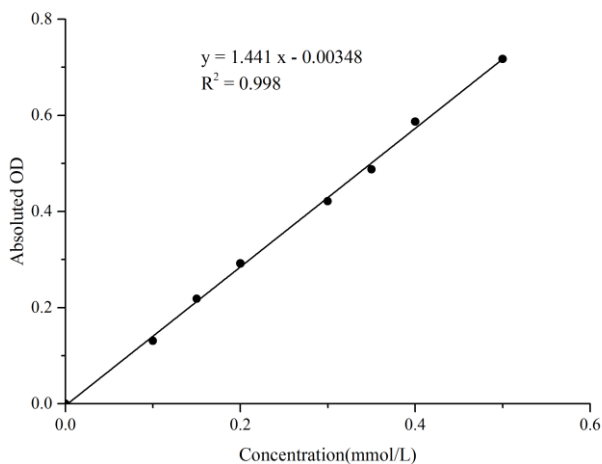
| | | | |
|------|--------------|-----|-----------|
| 检测范围 | 0.5-70.0 U/L | 批间差 | 2.3-3.9 % |
| 灵敏度 | 0.5 U/L | 批内差 | 1.0-3.2 % |
| 回收率 | 100-101 % | | |

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μ L, 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 | 0.063 | 0.195 | 0.283 | 0.351 | 0.485 | 0.552 | 0.648 | 0.78 |
| | 0.063 | 0.193 | 0.28 | 0.359 | 0.484 | 0.549 | 0.652 | 0.78 |
| 平均 OD 值 | 0.063 | 0.194 | 0.281 | 0.355 | 0.484 | 0.550 | 0.65 | 0.78 |
| 绝对 OD 值 | 0 | 0.131 | 0.218 | 0.292 | 0.421 | 0.487 | 0.587 | 0.717 |

② 绘制标曲(如下图):



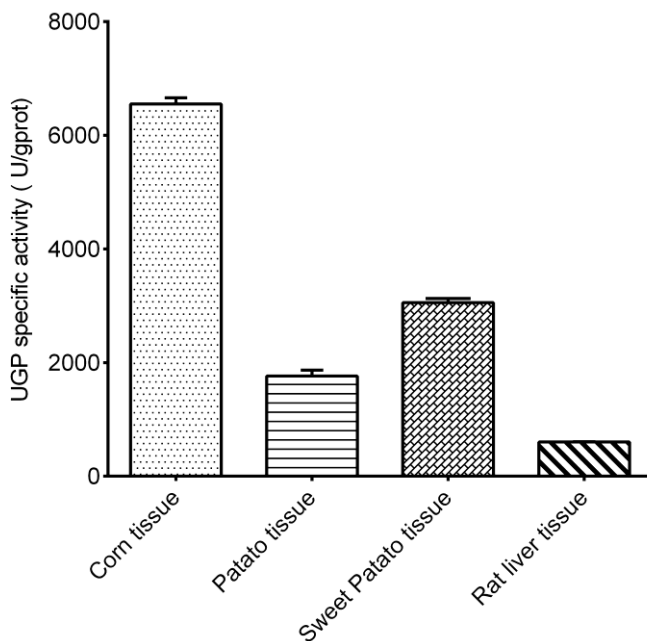
附录2 实例分析

例如检测土豆组织(数据仅供参考):

取20 μL 稀释40倍的10%土豆组织匀浆, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 1.441x - 0.00348$, 对照孔平均OD值为0.055, 测定孔平均OD值为0.537, $\Delta A_{450} = 0.537 - 0.055 = 0.482$, 测定出10%土豆组织匀浆的蛋白浓度为1.53 gprot/L, 计算结果为:

$$\text{UGP活力(U/gprot)} = (0.482 + 0.00348) \div 1.441 \div 5 \times 1000 \times 40 \div 1.53 = 1761.59 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作, 测定10%玉米组织 (10%组织匀浆蛋白浓度1.60gprot/L, 稀释200倍, 加样量20 μL)、10%土豆组织 (10%组织匀浆蛋白浓度1.53 gprot/L, 稀释40倍, 加样量20 μL)、10%红薯组织 (10%组织匀浆蛋白浓度2.07 gprot/L, 稀释100倍, 加样量20 μL)、10%大鼠肝组织 (10%组织匀浆蛋白浓度11.05 gprot/L, 稀释100倍, 加样量20 μL)中的UGP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。

