

真菌/酵母尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（UDP glucose pyrophosphorylase）活性
光谱法定量检测试剂盒产品说明书

主要用途

真菌/酵母尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（UDP glucose pyrophosphorylase）活性光谱法定量检测试剂是一种旨在通过尿苷二磷酸葡萄糖磷酸化酶、磷酸葡萄糖变位酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶连续反应系统中氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADP）还原后峰值的增高，即采用光谱法来测定样品中酶活性的权威而经典的技术方法。该技术经过精心研制、成功实验证明的。其适用于各种真菌/酵母细胞裂解悬液样品尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶的活性检测。产品严格无菌，即到即用，操作简捷，性能稳定。

技术背景

尿苷二磷酸葡萄糖磷酸化酶（uridine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase; UDP glucose pyrophosphorylase; UGPase; EC2.7.7.9），又称三磷酸尿苷葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶（UTP glucose-1-phosphate uridylyltransferase），是碳水化合物代谢中的主要酶蛋白，广泛存在于动物、植物和微生物细胞的胞浆里。在真核生物中，其氨基酸序列达55%同源。尿苷二磷酸葡萄糖磷酸化酶主要催化葡萄糖-1-磷酸（glucose-1-phosphate）和三磷酸尿苷（UTP）反应产生尿苷二磷酸葡萄糖（UDP glucose）和无机焦磷酸（pyrophosphate）的可逆反应。其功能在于通过核糖（nucleotide sugar）的UDP葡萄糖，作为糖苷基供体（glycosyl donor）和各种糖体分子前体（presursor），参与糖原、蔗糖、纤维素、糖脂、糖蛋白、蛋白聚糖以及酵母和植物细胞壁的生物合成。基于底物尿苷二磷酸葡萄糖和无机焦磷酸，通过尿苷二磷酸葡萄糖磷酸化酶、磷酸葡萄糖变位酶（phosphoglucumutase; PGM）和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（glucose-6-phosphate dehydrogenase; G-6-PDH）反应系统，测定氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADP）转化为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH）所产生的吸光峰值的变化（340nm 波长），来定量分析尿苷二磷酸葡萄糖磷酸化酶的活性。尿苷二磷酸葡萄糖磷酸化酶反应系统为：

产品内容

裂解液（Reagent A）	毫升
强化液（Reagent B）	毫升
缓冲液（Reagent C）	毫升
底物液（Reagent D）	毫升
反应液（Reagent E）	毫升
阴性液（Reagent F）	毫升
产品说明书	1 份

保存方式

保存裂解液（Reagent A）、底物液（Reagent D）和反应液（Reagent E）在-20℃冰箱里；其余的保存在4℃冰箱里；底物液（Reagent D）避免光照；有效保证6月

用户自备

1.5 毫升离心管：用于样品制备和保存的容器

15 毫升锥形离心管：用于样品制备的容器

（微型）台式离心机：用于样品操作

培养箱：用于反应孵育

比色皿或酶标板：用于光谱分析的容器

分光光度仪或酶标仪：用于光谱分析

实验步骤

实验开始前，将-20℃冰箱里的试剂盒中的**裂解液（Reagent A）**置入冰槽里融化。然后进行下列操作。

一、样品准备

1. 准备好 10 毫升待测的新鲜真菌/酵母细胞（OD₆₀₀=0.4 至 0.8，即 1 至 2 X 10⁷ 细胞/毫升）
2. 移入到预冷的 15 毫升锥形离心管
3. 置于冰槽里 5 分钟
4. 放进 4℃ 台式离心机离心 5 分钟，速度为 1000g
5. 小心抽去上清液
6. 加入 xx 微升**裂解液（Reagent A）**，充分混匀
7. 转移到预冷的 1.5 毫升离心管
8. 加入 xx 微升**强化液（Reagent B）**
9. 强力涡旋震荡 15 秒
10. 置于冰槽里 1 分钟
11. 重复实验步骤 9 至 10 五次
12. 加入 xx 微升**裂解液（Reagent A）**，充分混匀
13. 放进 4℃ 微型台式离心机离心 15 分钟，速度为 16000g（或 13000RPM，例如 eppendorf 5415）
14. 小心移取 500 微升上清液到新的预冷的 1.5 毫升离心管
15. 移取 10 微升进行蛋白定量检测（注意：建议使用 *Bradford* 蛋白质浓度定量试剂盒—HL30030.1）
16. 即刻放进-70℃保存或置于冰槽里继续后续操作

二、测定准备

1. 开启并设定好分光光度仪（温度为 37℃）：波长 340nm，间隔 5 分钟，读数 7 次（共 30 分钟），并置零
2. 从-20℃冰箱里取出试剂，置于冰槽里融化；**底物液（Reagent D）**避免光照
3. **缓冲液（Reagent C）**室温下均衡温度

三、背景对照测定

1. 移取 xx 微升**缓冲液（Reagent C）**到新的比色皿

2. 加入 xx 微升**底物液 (Reagent D)**
3. 加入 xx 微升**反应液 (Reagent E)**
4. 上下倾倒数次，混匀
5. 在 37℃ 温度下孵育 3 分钟
6. 加入 xx 微升**阴性液 (Reagent F)**
7. 上下倾倒数次，混匀（限定在 3 秒之内）
8. 即刻放进分光光度仪检测，此为背景空对照（30 分钟读数－0 分钟读数）

四、样品测定

1. 移取 xx 微升**缓冲液 (Reagent C)** 到新的比色皿
2. 加入 xx 微升**底物液 (Reagent D)**
3. 加入 xx 微升**反应液 (Reagent E)**
4. 上下倾倒数次，混匀
5. 在 37℃ 温度下孵育 3 分钟
6. 加入 20 微升待测样品（20 微克蛋白）（注意：样品须清澈）
7. 上下倾倒数次，混匀（限定在 3 秒之内）
8. 即刻放进分光光度仪检测，此为样品读数（30 分钟读数－0 分钟读数）

五、计算样品活性

六、酶标板测定

1. 在 96 孔酶标板上做好相应标记：背景对照和样品
2. 分别移取 xx 微升**缓冲液 (Reagent C)** 到 96 孔板中的所有孔中
3. 分别加入 xx 微升**底物液 (Reagent D)**
4. 分别加入 xx 微升**反应液 (Reagent E)**
5. 轻轻摇动 96 孔酶标板
6. 在 37℃ 温度下孵育 3 分钟
7. 分别加入 xx 微升**阴性液 (Reagent F)** 或待测样品（20 微克蛋白）到相应孔中（注意：样品须清澈）
8. 轻轻摇动酶标板
9. 即刻放进酶标仪检测：0 分钟读数和 30 分钟读数
10. 活性计算

注意事项

1. 本产品为 20 次（比色皿）和 80 次（酶标板）操作，包括背景对照
2. 操作时，须戴手套
3. 系统操作过程中，背景测定只需 1 次
4. 建议使用比色皿测定
5. 样品须澄清，至关重要
6. **强化液 (Reagent B)** 为固体状，移取方法为：使用 1 毫升枪头，将尖端部分剪去；或使用 0.5 毫升 PCR 管的盖子内圈盛满；或称重 0.1 克

7. 加样后 3 秒内光谱测定
8. 测定值由低到高变化；测定可持续 30 分钟
9. 光谱测定后，比色皿须清洗彻底
10. 样本测定 30 分钟读数高于 0 分钟读数表明具有酶活性
11. 建议待测样本蛋白浓度为 20 微克/20 微升；如果样本酶活性过低或过高，则可以增加或降低样本量（本公司提供 Bradford 蛋白质浓度定量试剂盒—HL30030.1）
12. 如果待测样品浓度过高或过低，可以调整样品浓度
13. 尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶单位活性定义为：在 37℃，pH 7.5 条件下，每分钟内能够还原 1 微摩尔烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADP）所需的酶量作为一个活性单位
14. 本公司提供系列生化酶学检测试剂产品

质量标准

1. 本产品经鉴定性能稳定
2. 本产品经鉴定检测敏感