

葡萄糖-1-磷酸(1PG/G1P)含量试剂盒说明书

(货号:ADS-W-T019 微板法 96 样)

一、产品简介:

糖原和淀粉在磷酸解过程中会生成葡萄糖-1-磷酸(1PG/G1P)。本试剂盒提供一种简单,灵敏,快速的测定方法:葡萄糖-1-磷酸(1PG/G1P)在磷酸葡萄糖变位酶和磷酸葡萄糖脱氢酶的相继作用下使 NADP⁺ 还原成 NADPH,通过检测 NADPH 在 340nm 处的增加量即可计算得出样品中的葡萄糖-1-磷酸(1PG/G1P)含量。

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 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 1 支	4°C保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉体 1 支	-20°C保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用。可-20°C分装冻存。
试剂三	液体 16mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉体 1 支	-20°C保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。可-20°C分装冻存。
标准品	粉剂 1 支	4°C保存	仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常(不参与结果计算)。 使用方法:用前标准管(G1P)甩几下使粉剂落入底部,再加 0.5mL 蒸馏水混匀溶解即浓度为 4mg/mL,再稀释 4 倍成 1mg/mL 的 G1P 后备用;按照加样表中的测定管操作(样本更换成备用浓度的标准品)。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、水浴锅、冰和蒸馏水。

四、葡萄糖-1-磷酸(1PG/G1P)含量测定:

1、样本制备

① 组织样本:

建议称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可以按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液,超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);12000rpm 4°C离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照细菌/细胞数量(10⁴):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

③ 液体样本:直接检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 340nm。

② 试剂解冻至室温(25°C)或可放在 25°C条件下水浴 5-15min。

③ 试剂一和二和三可按照 10:10:150 比例配成混合液(一枪加 170μL 该混合液)(该混合液用多少配多少,现配现用)。

④ 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
试剂一	10	10
试剂二	10	10
试剂三	150	170
样本	20	
混匀, 于室温 (25°C) 下孵育 20min 后于 340nm 处读取 A1 (若 A 值继续增加, 需延长孵育时间, 直至 2 分钟内吸光值不变)。		
试剂四	10	10
混匀, 于室温 (25°C) 下孵育 20min 后于 340nm 处读取 A2 (若 A 值继续增加, 需延长孵育时间, 直至 2 分钟内吸光值不变), $\Delta A = (A2 - A1)_{测定} - (A2 - A1)_{空白}$ 。		

【注】1. 若 ΔA 的差值在零附近徘徊, 可增加样本量 $V1$ (如增至 50μL, 则试剂三相应减少, 保持总体积不变), 或增加样本取样质量 W , 则改变后的 $V1$ 和 W 需代入公式重新计算。

2. 若 $A2$ 值超过 1.2, 可减少加样量 $V1$ (如减至 10μL, 则试剂三相应增加, 保持总体积不变), 或对样本用蒸馏水稀释 (保持加样体系不变), 则改变后的 $V1$ 和 D 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本重量计算:

$$1PG/G1P \text{ 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div (W \times V1 \div V)] \times D = 836 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按细胞数量计算:

$$1PG/G1P \text{ 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div (500 \times V1 \div V)] \times D = 1.7 \times \Delta A \times D$$

3、按照液体体积计算:

$$1PG/G1P \text{ 含量}(\mu\text{g}/\text{mL}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div V1] = 836 \times \Delta A$$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

V ---加入提取液体积, 1 mL;

$V2$ ---反应总体积; $0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$;

Mr ---葡萄糖-1-磷酸 (1PG/G1P) 分子量; 260;

D ---稀释倍数, 未稀释即为 1。

d ---96 孔板光径, 0.5cm;

$V1$ ---加入样本体积, 0.02mL;

W ---样本质量, g;

500---细胞数量, 万;