

## 磷酸葡萄糖异构酶 (glucose-6-phosphate isomerase) 试剂盒说明书 (货号: ADS-F-TYS007 分光法 48 样)

### 一、产品简介:

磷酸葡萄糖异构酶 (PGI, EC5.3.1.9) 能催化 6-磷酸果糖与 6-磷酸葡萄糖的相互转化, 是呼吸作用中参与糖酵解途径的一种重要的胞内酶。

磷酸葡萄糖异构酶 (PGI) 催化 6-磷酸果糖生成 6-磷酸葡萄糖, 接着在磷酸葡萄糖脱氢酶的作用下, 使 NADP<sup>+</sup> 还原成 NADPH, 通过检测在 340nm 处的上升量来计算 PGI 酶活大小。

### 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	粉剂 1 支	4℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.6mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	粉剂 1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 1.6mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 27mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	粉剂 1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.6mL 蒸馏水充分溶解备用。

### 三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、磷酸葡萄糖异构酶 (PGI) 活性测定:

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, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (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 500 万细菌或细胞加入 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, 可按照细菌/细胞数量 (10<sup>4</sup>): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

#### 2、上机检测:

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 设置温度 30℃, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- ② 试剂放在 30℃ 水浴 5min;
- ③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	70
试剂一	30
试剂二	30

试剂三	540
混匀, 30°C下孵育 10min	
试剂四	30
混匀, 30°C下, 立即于 340nm 处读取吸光值 A1, 10min 后读取 A2, $\Delta A=A2-A1$ 。	

**【注】**: 1.若 $\Delta A$  过小, 可以延长反应时间(如: 20min 或更长)再读取 A2, 或增加样本加样量 V1 (如增至 120 $\mu$ L, 则试剂三相应减小), 重新调整的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

2.若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样量 V1 (试剂三相应增加), 则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算:

### 1、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$PGI(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 160.8 \times \Delta A \div Cpr$$

### 2、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$PGI(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 160.8 \times \Delta A \div W$$

### 3、按细胞数量计算:

单位定义: 每 1 万个细胞每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$PGI(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.322 \times \Delta A$$

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

d---光径, 1cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.07mL;

V2---反应体系总体积,  $7 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;

T---反应时间, 10 min;

W---样本质量, g;

500---细胞数量, 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。