

葡萄糖-1-磷酸(1PG/G1P)含量试剂盒说明书

(货号:ADS-F-T019 紫外分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

| 试剂组分 | 试剂规格 | 存放温度 | 注意事项 |
|------|-------------|-----------|--|
| 提取液 | 液体 60mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 粉体 1 支 | 4°C保存 | 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.8mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂二 | 粉体 1 支 | -20°C保存 | 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.8mL 蒸馏水溶解备用。可-20°C分装冻存。 |
| 试剂三 | 液体 30mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂四 | 粉体 1 支 | -20°C避光保存 | 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用。可-20°C分装冻存。 |
| 标准品 | 粉剂 1 支 | 4°C避光保存 | 使用方法: 1. 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 8 倍成 0.5mg/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); 2. 仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常 (不参与结果计算)。 |

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

1、样本提取

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 (10^4)：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、检测步骤：

① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

② 试剂解冻至室温 (25°C)。

③ 试剂一和二和三可按照 30:30:560 比例配成混合液（一枪加 620 μ L 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。

④ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中按照下表依次加入试剂：

| 试剂组分 (μ L) | 测定管 | 空白管（仅做一次） |
|---|-----|-----------|
| 试剂一 | 30 | 35 |
| 试剂二 | 30 | 35 |
| 试剂三 | 560 | 630 |
| 样本 | 80 | |
| 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 | 20 | 20 |
| 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）， $\Delta A = (A2 - A1) - \text{测定} - (A2 - A1) \text{空白}$ 。 | | |

【注】1. 若 ΔA 的差值在零附近徘徊，可增加样本量 V1（如增至 150 μ L，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 40 μ L，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：

$$1PG/G1P \text{ 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div (W \times V1 \div V) \times D = 365.8 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按细胞数量计算：

$$1PG/G1P \text{ 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div (500 \times V1 \div V) \times D = 0.74 \times \Delta A \times D$$

3、按照液体体积计算：

$$1PG/G1P \text{ 含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div V1 = 365.8 \times \Delta A$$

4、按蛋白浓度计算：

$$1PG/G1P \text{ 含量}(\mu\text{g}/\text{mg prot}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div (Cpr \times V1 \div V) \times D = 365.8 \times \Delta A \div Cpr \times D$$

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

d---光径，1cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.08mL；

V2---反应总体积； $0.7\text{mL} = 7 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

W---样本质量，g；

Mr---葡萄糖-1-磷酸 (1PG/G1P) 分子量；260；

500---细胞数量，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL)；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。