

## 磷酸葡萄糖变位酶 (PGM) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-FM032 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

### 一、产品简介:

磷酸葡萄糖变位酶 (PGM) 在碳水化合物代谢中起关键作用, 并广泛存在于所有生物体中。PGM 可使葡萄糖-1-磷酸 (G1P) 和葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 互变。当糖原分解时, PGM 将 G1P 转化为 G6P, 接着进入糖酵解途径产生 ATP, 也可通过戊糖磷酸途径产生核糖和 NADPH。相反, 当细胞需要能量时 PGM 将 G6P 转化为 G1P, 进而产生糖原。PGM 的缺乏可导致与葡萄糖存储相关的疾病。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法: PGM 将葡萄糖-1-磷酸转化为葡萄糖-6-磷酸; 葡萄糖-6-磷酸通过葡萄糖-6-磷酸脱氢酶氧化形成 NADPH, 接着与特异显色剂反应生成有色物质, 通过检测该有色物在 450nm 的增加速率, 进而计算出 PGM 酶活性大小。

### 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°C保存   |  |
| 试剂一  | 粉剂 1 支      | 4°C避光保存 | 1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底;<br>2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂二  | 粉剂 1 支      | 4°C保存   | 1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底;<br>2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂三  | 液体 3mL×1 瓶  | 4°C避光保存 |  |
| 试剂四  | 液体 35mL×1 瓶 | 4°C保存   |  |
| 试剂五  | 粉剂 1 瓶      | -20°C保存 | 1. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩);<br>2. 加入 2.4mL 蒸馏水充分溶解备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。           |
| 标准品  | 粉剂 1 支      | -20°C保存 | 1. 若重新做标曲, 则用到该试剂;<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制;<br>3. 溶解后的标品一周内用完。                      |

### 三、所需的仪器和用品:

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 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

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 15min，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 细胞样本：先收集细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细胞加入 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）；4℃ 约 12,000rpm 离心 10min，取上清作为待测样品。

【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：澄清的液体样本直接检测，若浑浊可 12000rpm、4℃离心 10min，取上清液作为待测样本。

## 2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，设置温度 37℃,调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

② 试剂放在 37℃水浴 5min；

③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

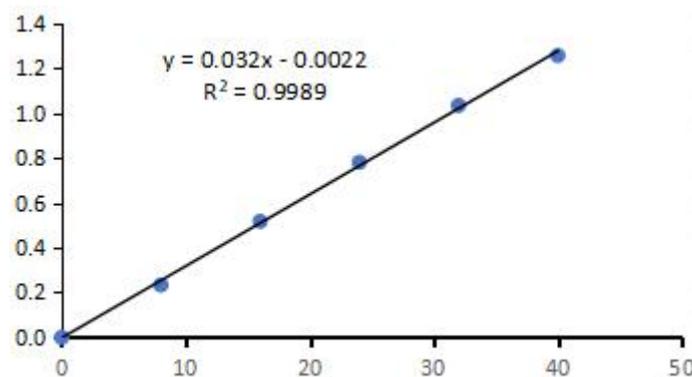
| 试剂名称 (μL)  | 测定管 |
|--|-----|
| 样本   | 40  |
| 试剂一  | 20  |
| 试剂二  | 20  |
| 试剂三  | 40  |
| 试剂四  | 640 |
| 混匀，37℃条件下孵育 10min  |     |
| 试剂五  | 40  |
| 混匀，37℃条件下，1min 时于 450nm 处读取吸光值 A1，<br>11min 时读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。 |     |

【注】：1. 若  $\Delta A$  过小，可以延长反应时间 T（如：21min 或更长）再读取 A2，或增加样本量 V1（如增至 80μL，则试剂四相应减小），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 A2 值大于 1.5，可缩减反应时间 T（如：6min 或更短）再读取 A2，或减少样本量 V1（如减至 20μL，则试剂四相应增加），重新调整的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.032x - 0.0022$ ，x 是标准品摩尔质量：nmol，y 是  $\Delta A$ 。



2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟使 1nmol NADP<sup>+</sup>转换成 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{PGM}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[(\Delta A+0.0022)\div 0.032]\div(V1\times Cpr)\div T=78.13\times(\Delta A+0.0022)\div Cpr$$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟使 1nmol NADP<sup>+</sup>转换成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PGM}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[(\Delta A+0.0022)\div 0.032]\div(W\times V1\div V)\div T=78.13\times(\Delta A+0.0022)\div W$$

4、按细胞数量计算：

单位定义：每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟使 1nmol NADP<sup>+</sup>转换成 1nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

$$\text{PGM}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0022)\div 0.032]\div(500\times V1\div V)\div T=0.156\times(\Delta A+0.0022)$$

5、按液体体积计算：

单位定义：每毫升液体每分钟使 1nmol NADP<sup>+</sup>转换成 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{PGM}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[(\Delta A+0.0022)\div 0.032]\div V1\div T=78.13\times(\Delta A+0.0022)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

W---样本质量，g；

T---反应时间，10 min；

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。

附：标准曲线制作过程：

1 向标准品 EP 管里面加入 0.6mL 蒸馏水（母液需在两天内用且 -20℃ 保存），标准品母液浓度为 1nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 nmol/μL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

|                 |     |     |     |     |     |     |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标品浓度<br>nmol/μL | 0   | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1   |
| 标品稀释液<br>uL     | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL            | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |

各标准管混匀待用。

3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

| 试剂名称 (μL)                                     | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|---|-----|--------------|
| 标品  | 40  |              |
| 蒸馏水   |     | 40           |
| 试剂一   | 20  | 20           |
| 试剂二   | 20  | 20           |
| 试剂三   | 40  | 40           |
| 试剂四   | 640 | 640          |
| 混匀，37℃条件下孵育 10min                             |     |              |
| 试剂五   | 40  | 40           |
| 混匀，37℃条件下，于 450nm 处读取吸光值 A，<br>ΔA=A 测定-0 浓度管。 |     |              |