

磷酸葡萄糖变位酶 (PGM) 试剂盒说明书 (微板法 96 样)

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 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂三	液体 1mL×1 支	4℃ 保存	
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用。
标准品	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰。

四、磷酸葡萄糖变位酶 (PGM) 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 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。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 设置温度 37℃, 调节波长至 450nm。

② 试剂放在 37℃ 水浴 5min;

③ 在 96 孔板中依次加入:

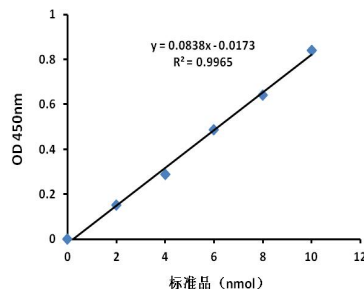
试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10

试剂二	10
试剂三	10
试剂四	150
混匀, 37°C 条件下孵育 10min	
试剂五	10
混匀, 37°C 条件下, 1min 时于 450nm 处读取吸光值 A1, 11min 时读取 A2, $\Delta A=A2-A1$ 。	

- 【注】:** 1. 若 ΔA 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 20 μ L, 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 5 μ L, 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: $y = 0.0838x - 0.0173$, x 是标准品摩尔质量: nmol, y 是 ΔA 。



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⁺ 转换成 1nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{PGM (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0173) \div 0.0838] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 119.3 \times (\Delta A + 0.0173) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算:

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

$$\text{PGM (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0173) \div 0.0838] \div (W \times V1 \div V) \div T = 119.3 \times (\Delta A + 0.0173) \div W$$

4、按细胞数量计算:

单位定义: 每 10⁴ 个细胞每分钟使 1nmol NADP⁺ 转换成 1nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

$$\text{PGM (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0173) \div 0.0838] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.24 \times (\Delta A + 0.0173)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.01 mL;

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 制备标准品母液 (1nmol/ μ L): 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°C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0nmol/ μ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。