

磷酸葡萄糖异构酶（glucose-6-phosphate isomerase）试剂盒说明书

（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⁺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 mg×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 mg×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 mg×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（10⁴）：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℃下孵育 10min	
试剂四	30
混匀，30℃下，立即于 340nm 处读取吸光值 A1，10min 后读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

- 【注】:** 1.若 ΔA 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 μ 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。

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

ϵ ---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。