

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

（货号：BP10121W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

磷酸葡萄糖异构酶（PGI，EC 5.3.1.9）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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使粉剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使粉剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 的蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使粉剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，设置温度 30℃，调节波长至 340nm。
- ② 试剂放在 30℃水浴 5min；
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	150
混匀，30℃下孵育 10min	
试剂四	10
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 40μL，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，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。

$$PGI(nmol/min/mg \text{ prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 321.5 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$PGI(nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 321.5 \times \Delta A \div W$$

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。

$$PGI(nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

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

d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

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。