

磷酸葡萄糖变位酶（PGM）试剂盒说明书

（货号：BP10333W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 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	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 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。
试剂三	液体 2mL×1 支	4℃避光保存	
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 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。
标准品	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

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 15min，取上清液作为待测样本。

【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）；12000rpm、4℃离心 10min，取上清液作为待测样本。

【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。

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、检测步骤：

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

② 所有试剂于 37℃条件下水浴 5-10min；

③ 在 96 孔板中依次加入：

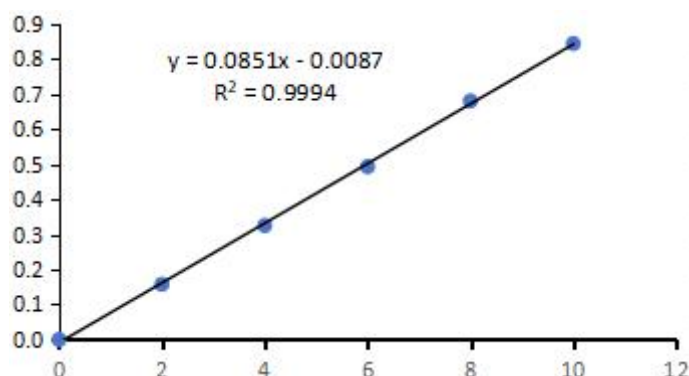
试剂组分（μL）	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	150
混匀，37℃条件下孵育 10min	
试剂五	10
混匀，37℃条件下，1min 时于 450nm 处读取吸光值 A1，11min 时读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

【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 20μL，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 5μL，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： $y = 0.0851x - 0.0087$ ，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。

$$\text{PGM}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.0851] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 117.5 \times (\Delta A + 0.0087) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{PGM}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.0851] \div (W \times V1 \div V) \div T = 117.5 \times (\Delta A + 0.0087) \div W$$

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。

$$\text{PGM}(\text{nmol/min/10}^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.0851] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.235 \times (\Delta A + 0.0087)$$

5、按液体体积计算：

单位定义：每毫升液体每分钟使 1nmol NADP⁺转换成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PGM}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.0851] \div V1 \div T = 117.5 \times (\Delta A + 0.0087)$$

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 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 nmol/μL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 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	10	
蒸馏水		10
试剂一	10	10

试剂二	10	10
试剂三	10	10
试剂四	150	150
混匀，37℃条件下孵育 10min		
试剂五	10	10
混匀，37℃条件下，于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{浓度管}}$		