

磷酸葡萄糖变位酶(PGM)试剂盒

分 光 法 48 样

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。

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	-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 2mL×1 支	4℃保存	
试剂四	液体 32mL×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 2.4mL 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。

所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、水浴锅、台式离心机、可调式移液枪。

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（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

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, 11min 时读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

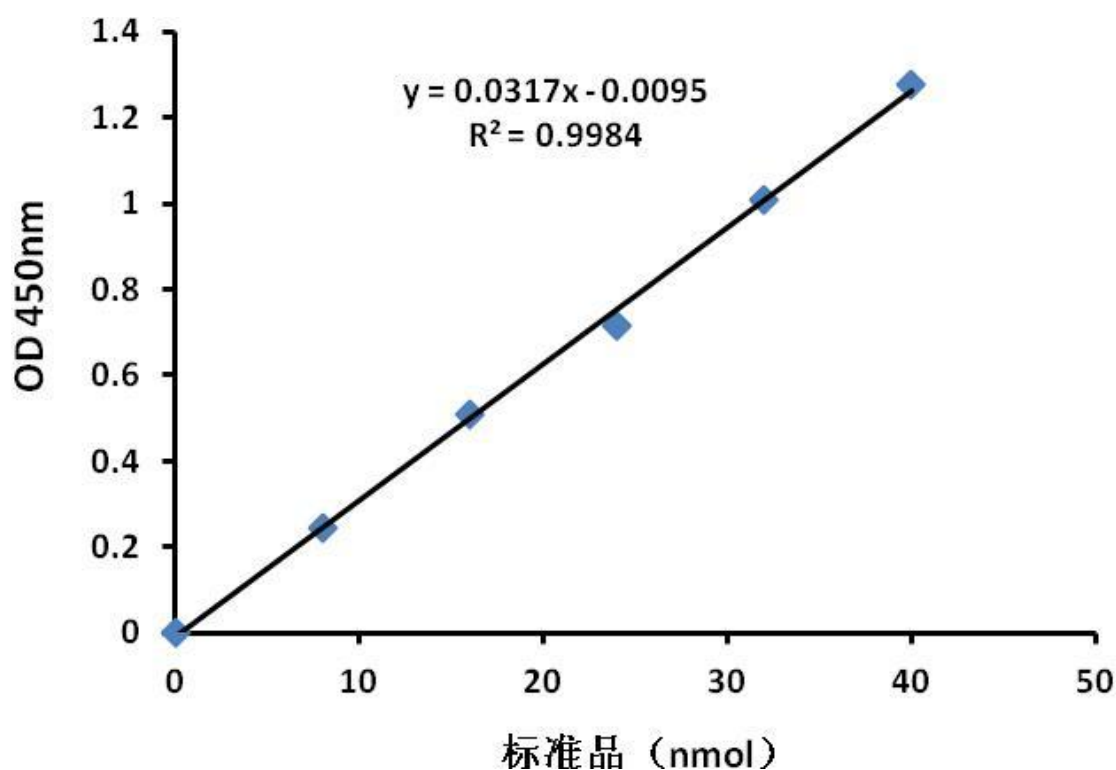
[注]: 1. 若 ΔA 过小, 可以延长反应时间 T (如: 21min 或更长) 再读取 A2, 或增加样本量 V1 (如增至 80μL, 则试剂四相应减小), 重新调整的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

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。

结果计算:

1、标准曲线方程:

$y = 0.0317x - 0.0095$, 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 1nmolNADP⁺ 转换成 1nmolNADPH 为一个酶活单位。

PGM (nmol/min/mgprot) = $[(\Delta A + 0.0095) \div 0.0317] \div (V1 \times Cpr) \div T = 78.86 \times (\Delta A + 0.0095) \div Cpr$

3、按样本鲜重计算：

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

PGM (nmol/min/g 鲜重) = $[(\Delta A + 0.0095) \div 0.0317] \div (W \times V1 \div V) \div T = 78.86 \times (\Delta A + 0.0095) \div W$

4、按细胞数量计算：

单位定义: 每 10^4 个细胞每分钟使 1nmolNADP^+ 转换成 1nmolNADPH 定义为一个酶活单位。
 $\text{PGM (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A + 0.0095) \div 0.0317] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.158 \times (\Delta A + 0.0095)$

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 ($1\text{nmol}/\mu\text{L}$)：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, $1.0\text{ nmol}/\mu\text{L}$ 。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。