

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

（微板法 96 样）

### 一、产品简介：

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<sup>+</sup>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 100mL×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 1.1mL 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 1.1mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 15mL×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 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用。

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、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（10<sup>4</sup>）：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 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：

试剂名称（ $\mu$ L）	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 $\Delta A$  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 40 $\mu$ 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，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。

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

### 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。

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

### 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。

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

$\epsilon$ ---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。