

## 葡萄糖-1-磷酸(1PG/G1P)和葡萄糖-6-磷酸(G6P)含量试剂盒说明书

(货号:G08106F 紫外法 48 样)

### 一、产品简介:

糖原和淀粉在磷酸解过程中会生成葡萄糖-1-磷酸(1PG/G1P)。本试剂盒提供一种简单,灵敏,快速的测定方法:葡萄糖-1-磷酸(1PG/G1P)在磷酸葡萄糖变位酶和磷酸葡萄糖脱氢酶的相继作用下使 NADP<sup>+</sup>还原成 NADPH;而葡萄糖-6-磷酸(G6P)在磷酸葡萄糖脱氢酶作用下使 NADP<sup>+</sup>还原成 NADPH,通过检测 NADPH 在 340nm 处的增加量分别计算得出样品中的葡萄糖-1-磷酸(1PG/G1P)和葡萄糖-6-磷酸(G6P)含量。

### 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°C 保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4°C 保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.8mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	粉体 mg×1 支	-20°C 保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.8mL 蒸馏水溶解备用。可-20°C 分装冻存,尽量避免反复冻融。
试剂四	粉体 mg×1 支	-20°C 保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用。可-20°C 分装冻存,尽量避免反复冻融。
标准品 1	粉体 mg×1 支	4°C 保存	仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常(不参与结果计算)。使用方法:用前标准管(G6P)甩几下使粉剂落入底部,再加 0.5mL 蒸馏水混匀溶解即浓度为 40μmol/mL,再稀释 80 倍成 0.5μmol/mL 的 G6P 后备用;按照加样表中测定管操作(样本更换成备用浓度标准品)。
标准品 2	粉剂×1 支	4°C 保存	仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常(不参与结果计算)。使用方法:用前标准管(G1P)甩几下使粉剂落入底部,再加 0.5mL 蒸馏水混匀溶解即浓度为 10μmol/mL,再稀释 10 倍成 1μmol/mL 的 G1P 后备用;按照加样表中的测定管操作(样本更换成备用浓度的标准品)。

### 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、水浴锅/恒温培养箱、冰和蒸馏水。

### 四、葡萄糖-1-磷酸(1PG/G1P)和葡萄糖-6-磷酸(G6P)含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品和实验流程,避免样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备

① 组织样本:建议称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C 离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可以按照组织质量(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;取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液,超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);12000rpm 4°C 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。

③ 液体样本:直接检测。

#### 2、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 340nm,蒸馏水调零。

- ② 试剂解冻至室温 (25°C) 或可放在水浴锅 (25°C) 中孵育 5-15min。
- ③ 试剂一和二可按照 30:560 比例配成混合液 (一枪加 590μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。
- ④ 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中按照下表依次加入试剂:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	80
试剂一	30
试剂二	560
混匀, 于室温 (25°C) 下孵育 10min 后于 340nm 处读取 A1。	
试剂二	30
混匀, 于室温 (25°C) 下孵育 20min 后于 340nm 处读取 A2 (直到 2min 内 A2 值变化小于 0.05)。	
试剂四	20
混匀, 于室温 (25°C) 下孵育 20min 后于 340nm 处读取 A3 (直到 2min 内 A3 值变化小于 0.02)。	

## 五、结果计算:

### A: 葡萄糖-6-磷酸(G6P)的计算公式:

$$\Delta A (G6P) = A2 - A1;$$

#### 1、按样本重量计算:

$$G6P \text{ 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr1) \div (W \times V1 \div V)] \times D = 365.8 \times \Delta A \div W \times D$$

#### 2、按细胞数量计算:

$$G6P \text{ 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr1) \div (500 \times V1 \div V)] \times D = 0.73 \times \Delta A \times D$$

#### 3、按照液体体积计算:

$$G6P \text{ 含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr1) \div V1] \times D = 365.8 \times \Delta A$$

### B: 葡萄糖-1-磷酸 (1PG/G1P) 的计算公式:

$$\Delta A (G1P) = A3 - A2;$$

#### 1、按样本重量计算:

$$1PG/G1P \text{ 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V3 \times 10^6 \times Mr2) \div (W \times V1 \div V)] \times D = 376.2 \times \Delta A \div W \times D$$

#### 2、按细胞数量计算:

$$1PG/G1P \text{ 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V3 \times 10^6 \times Mr2) \div (500 \times V1 \div V)] \times D = 0.75 \times \Delta A \times D$$

#### 3、按照液体体积计算:

$$1PG/G1P \text{ 含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V3 \times 10^6 \times Mr2) \div V1] \times D = 376.2 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;  $d$ ---96 孔板光径, 1cm;  $W$ ---样本质量, g;

$V$ ---加入提取液体积, 1 mL;  $V1$ ---加入样本体积, 0.08mL; 500---细胞数量, 万;

$V2$ ---反应总体积; 0.7mL= $7 \times 10^{-4}$ L;  $V3$ ---反应总体积; 0.72mL= $7.2 \times 10^{-4}$ L;  $D$ ---稀释倍数, 未稀释即为 1;

$Mr1$ ---葡萄糖-6-磷酸 (G6P) 分子量; 260;  $Mr2$ ---葡萄糖-1-磷酸 (1PG/G1P) 分子量; 260。