

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:G08106W 微板法 96 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⁺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⁺还原成 NADPH,通过检测 NADPH 在 340nm 处的增加量分别计算出样品中的葡萄糖-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 100mL×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 1.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 16mL×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 1.2mL 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 40 倍成 1μmol/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:

酶标仪、96 孔板、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(10⁴):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 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 340nm。

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 10:150 比例配成混合液（一枪加 160μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	150
混匀，于室温 (25°C) 下孵育 10min 后于 340nm 处读取 A1。	
试剂三	10
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	10
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)。 $\Delta A(G6P)=A2-A1$ ； $\Delta A(G1P)=A3-A2$ 。	

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：

$$G6P \text{ 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d \times V2 \div V3) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div (W \times V1 \div V)] \times D = 836 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按细胞数量计算：

$$G6P \text{ 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d \times V2 \div V3) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div (500 \times V1 \div V)] \times D = 1.7 \times \Delta A \times D$$

3、按照液体体积计算：

$$G6P \text{ 含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d \times V2 \div V3) \times V2 \times 10^6 \times Mr) \div V1] = 836 \times \Delta A$$

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：

$$1PG/G1P \text{ 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V3 \times 10^6 \times Mr) \div (W \times V1 \div V)] \times D = 836 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按细胞数量计算：

$$1PG/G1P \text{ 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V3 \times 10^6 \times Mr) \div (500 \times V1 \div V)] \times D = 1.7 \times \Delta A \times D$$

3、按照液体体积计算：

$$1PG/G1P \text{ 含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V3 \times 10^6 \times Mr) \div V1] = 836 \times \Delta A$$

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； W ---样本质量，g；

V ---加入提取液体积，1 mL； $V1$ ---加入样本体积，0.02mL； 500---细胞数量，万；

$V2$ ---反应总体积；0.19mL= $1.9 \times 10^{-4}\text{L}$ ； $V3$ ---反应总体积；0.2mL= $2 \times 10^{-4}\text{L}$ ； 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。