

磷酸葡萄糖异构酶 (Phosphoglucose Isomerase, PGI)

试剂盒说明书

分光光度法 50T/48S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义

磷酸葡萄糖异构酶 (PGI) 催化葡萄糖-6-磷酸转化为果糖-6-磷酸的可逆反应，是在糖酵解的第二步中具有重要作用的一种酶。

测定原理

磷酸葡萄糖异构酶催化果糖-6-磷酸转化为葡萄糖-6-磷酸，G6PDH 催化葡萄糖-6-磷酸反应，同时使 NADP 转化为 NADPH，在 340nm 下测定吸光值增加速率来反映酶活性。

自备实验用品及仪器

天平、低温离心机、研钵、震荡仪、紫外分光光度计、1mL 石英比色皿。

试剂组成和配制

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 60mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存。临用前加 50mL 试剂一充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂三：液体×1 管，-20℃ 保存。临用前加 1 mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

粗酶液提取

1. 组织样本：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 细胞、细菌样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个)：提取液体积 (mL) 为 1000~5000：1 的比例（建议 2000 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 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定操作

1. 分光光度计预热 30min，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
2. 将试剂三用蒸馏水稀释 50 倍，临用前配制，用多少配多少。
3. 取 1mL 石英比色皿，依次加入 50μL 粗酶液，50μL 试剂三，最后加入 900μL 试剂一，立即混匀，记录 340nm 处 10s 的吸光值 A1 和 70s 的吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

计算公式

(1) 按照样本蛋白浓度计算

酶活单位定义：每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PGI (nmol/min/mg prot)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 3215 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活单位定义：每克组织每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PGI (nmol/min/g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3215 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PGI (nmol/min / } 10^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 1.61 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1mL; ε : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 1 min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g