

葡萄糖-6-磷酸酶 (G6Pase)活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10308F 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、产品简介:

葡萄糖-6-磷酸酶 ((glucose 6 phosphatase, G6Pase, EC 3.1.3.9) 主要存在于肝脏、肾脏、小肠粘膜细胞、胰岛细胞中, 催化 6-磷酸葡萄糖水解为葡萄糖的关键酶, 该反应是糖原分解和糖异生的最后一步反应。在保证血糖的动态平衡方面起着重要的作用。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法: G6Pase 催化葡萄糖-6-磷酸生成葡萄糖, 变旋酶和葡萄糖脱氢酶进一步依次催化 NAD^+ 还原生成 NADH, NADH 与一种显色探针反应生成有色物质, 通过检测该有色物质的增加速率即可计算出 G6Pase 酶活性大小。

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60mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂1支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂1支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体1支	4℃保存	1. 用前加 1ml 蒸馏水充分溶解; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体1mL×1支	4℃避光保存	
试剂五	液体34mL×1瓶	4℃保存	
标准品	粉剂1支	-20℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、所需的仪器和用品:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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 细菌或培养细胞：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℃离心 15min，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。

2、上机检测：

① 分光光度计预热 30min 以上，设置温度 25℃,调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

② 试剂解冻至室温（25℃）；若一次检测样本数较多，可将试剂一和二和三等比例混匀后再一起加 60μL，其他试剂加样量不变

③ 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

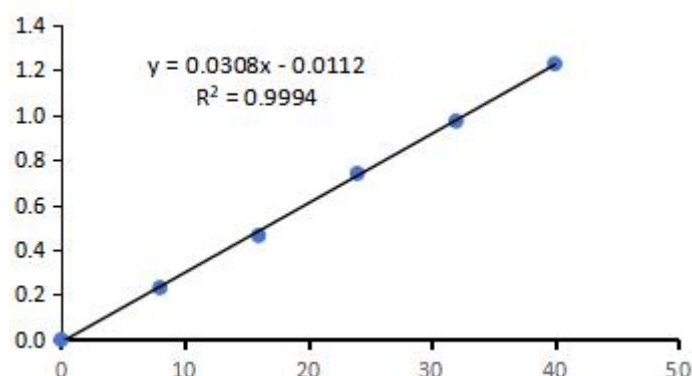
试剂名称（μL）	测定管
样本	40
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	20
试剂五	680
混匀，25℃条件下，立即于 450nm 处读取 A1 值，20min 后读取 A2 值，（观察：酶活性越大，则黄色越明显）。ΔA=A2-A1。	

【注】：1.若ΔA 过小，可以延长反应时间（如：60min 或更长）再读取 A2，或增加样本加样体积 V1（如增至 70μL，则试剂五相应减少），则改变后的反应时间 T 和加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

2.若样本自身含有较高水平葡萄糖，为了消除样本自身的背景值，需增设一个样本自身对照，即对照管换成 40μL 的煮沸样本（95-100℃煮沸 10min,室温离心，取上清液测定），其他不变。ΔA= A2 测定- A2 对照。

五、结果计算：

1、标准曲线：y = 0.0308x - 0.0112；x 是 NADH 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催化 1 nmolNAD⁺生成 1nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$G6Pase(nmol/min /mg prot)=[(\Delta A+0.0112)\div 0.0308]\div (V1\times Cpr)\div T=40.58\times (\Delta A+0.0112)\div Cpr$$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟催化 1 nmolNAD⁺生成 1nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$G6Pase(nmol/min/g \text{ 鲜重})=[(\Delta A+0.0112)\div 0.0308]\div (W\times V1\div V)\div T=40.58\times (\Delta A+0.0112)\div W$$

4、按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细胞/细胞每分钟催化 1nmolNAD⁺生成 1nmol NADH 定为一个酶活单位。

$$G6Pase(nmol/min/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0112)\div 0.0308]\div (500\times V1\div V)\div T=0.08\times (\Delta A+0.0112)$$

V----加入提取液体积，1 mL；

V1----加入样本体积，0.04mL；

W----样本质量，g。

T----反应时间，20 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 向标准品 EP 管里面加入 1.41mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存），标准品母液浓度为 1nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/μL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 nmol/μL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	40	
蒸馏水		40
试剂四	20	20
试剂五	680	680
混匀，25℃条件下，立即于 450nm 处读取 A 值， ΔA=A 测定-0 浓度管。		