

葡萄糖-6-磷酸酶 (G6Pase)活性测定试剂盒说明书

(货号: G0557W 微板法 96 样)

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 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	使用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解,
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	使用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解,
试剂三	液体 μL ×1 支	-20℃ 保存	使用前甩几下使液体落入底部, 再加 1mL 蒸馏水充分溶解,
试剂四	液体 1mL×1 支	4℃ 保存	
试剂五	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

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、葡萄糖-6-磷酸酶 (G6Pase)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 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 (10^4): 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 25℃, 调节波长至 450nm。

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 30 μL , 其他试剂加样量不变

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10

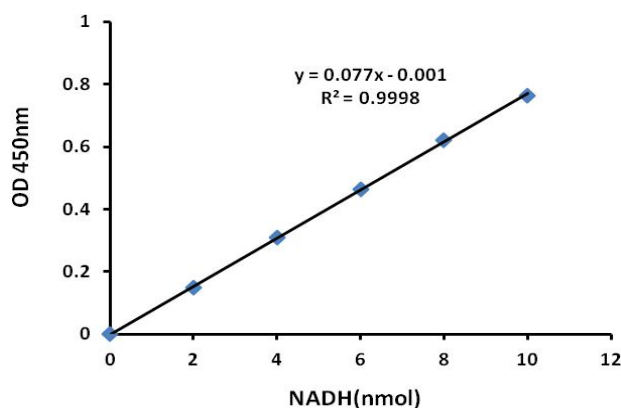
试剂三	10
试剂四	10
试剂五	150
混匀，25℃条件下，立即于 450nm 处读取 A1 值，20min 后读取 A2 值，（观察：酶活性越大，则黄色越明显）。 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【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 30 μ L，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 10 μ L 的煮沸样本（95-100℃煮沸 10min,室温离心，取上清液测定），其他不变。 $\Delta A = A2 \text{ 测定} - A2 \text{ 对照}$ 。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.077x - 0.001$ ；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。

$$G6Pase(nmol/min/mg \text{ prot}) = [(\Delta A + 0.001) \div 0.077] \div (V1 \times Cpr) \div T = 64.94 \times (\Delta A + 0.001) \div Cpr$$

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。

$$G6Pase(nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [(\Delta A + 0.001) \div 0.077] \div (W \times V1 \div V) \div T = 64.94 \times (\Delta A + 0.001) \div W$$

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。

$$G6Pase(nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.001) \div 0.077] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.13 \times (\Delta A + 0.001)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

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 制备标准品母液（1nmol/ μ L）：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）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/ μ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照 10 μ L 标准品+10 μ L 试剂四+180 μ L 试剂五加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。