

葡萄糖-6-磷酸酶 (G6P) 活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC3325

规格: 100T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

| 试剂名称 | 规格 | 保存条件 |
|------|--------------|---------|
| 提取液 | 液体 60 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂一 | 液体 12 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂二 | 粉剂×2 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂三 | 粉剂×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂四 | 粉剂×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂五 | 液体 4 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 标准品 | 液体 1 mL×1 支 | 2-8°C保存 |

溶液的配制:

- 1、试剂三: 临用前用 4 mL 蒸馏水溶解备用。
- 2、试剂四: 临用前用 4 mL 蒸馏水溶解备用。
- 3、标准品: 10 μmol/mL 磷标准液。临用前用蒸馏水稀释 16 倍至 0.625 μmol/mL 的标准溶液备用。
- 4、工作液的配制: 试剂二中加入 5 mL 试剂一充分溶解备用。可以将工作液分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。
- 5、定磷试剂的配制: 按 H₂O:试剂三:试剂四:试剂五 (V:V:V:V) =2:1:1:1 的比例配制, 配好的定磷剂应为浅黄色。若无色则试剂失效, 若是蓝色则为磷污染, 定磷剂现用现配。

注意: 配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器, 也可以用一次性塑料器皿, 避免磷污染。

产品说明:

葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose 6 phosphatase, G6Pase, EC 3.1.3.9) 是一种水解磷酸化合物的磷酸酶, 广泛存在于动物、植物、微生物和细胞中, 是糖异生过程水解葡萄糖-6-磷酸生成葡萄糖的限制酶, 在保证血糖的动态平衡方面起着重要的作用。

G6P催化葡萄糖-6-磷酸生成葡萄糖和无机磷, 利用钼蓝法测定无机磷含量的增加, 即可反映G6P活性。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、低温台式离心机、水浴锅、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、EP管、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1、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; 按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 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 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、组织：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。

3、血清（浆）样本：直接检测。

二、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至660nm，蒸馏水调零。

2、操作表：

| | 测定管 | 对照管 | 标准管 | 空白管 |
|--|-----|-----|-----|-----|
| 样本 (μL) | 20 | 20 | | |
| 工作液 (μL) | 80 | - | | |
| 充分混匀，37℃（哺乳动物）或者25℃（其他物种）水浴反应10min。反应后迅速放入沸水中沸水浴10min。取出冷却至常温 | | | - | - |
| 工作液 (μL) | - | 80 | | |
| 10000rpm常温离心10min后取上清。 | | | | |
| 上清液 (μL) | 25 | 25 | - | - |
| 标准溶液 (μL) | - | - | 25 | - |
| 定磷试剂 (μL) | 125 | 125 | 125 | 125 |
| 蒸馏水 (μL) | 100 | 100 | 100 | 125 |
| 充分混匀，40℃反应 10min。吸取 200μL 于微量玻璃比色皿或者 96 孔板中，测量 660nm 处吸光值，测定管、对照管、空白管、标准管测定的吸光度分别记为 A 测定管、A 对照管、A 空白管、A 标准管。计算 $\Delta A = A$ 测定管 - A 对照管， $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。 | | | | |

三、G6P 活性计算

1、血清（浆）G6P活力计算

单位定义：每mL血清（浆）每分钟生成1nmol无机磷定义为一个酶活力单位。

$$G6P (U/mL) = \Delta A \div (\Delta A_{标准} \div C_{标准}) \times 1000 \times V_{酶促} \div V_{样本} \div T = 312.5 \times \Delta A \div \Delta A_{标准}$$

2、组织、细菌或细胞中G6P活力计算

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每mg组织蛋白每分钟生成1nmol无机磷定义为一个酶活力单位。

$$G6P (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (\Delta A_{标准} \div C_{标准}) \times 1000 \times V_{酶促} \div (C_{pr} \times V_{样本}) \div T = 312.5 \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \div C_{pr}$$

(2) 按样本质量计算：

单位定义：每g组织每分钟生成1nmol无机磷定义为一个酶活力单位。

$$G6P (U/g \text{ 质量}) = \Delta A \div (\Delta A_{标准} \div C_{标准}) \times 1000 \times V_{酶促} \div (W \div V_{提取} \times V_{样本}) \div T = 312.5 \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \div W$$

(3) 按细菌或细胞数量计算：

单位定义：每1万个细菌或细胞每分钟生成1nmol无机磷定义为一个酶活力单位。

$$G6P (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (\Delta A_{标准} \div C_{标准}) \times 1000 \times V_{酶促} \div (500 \div V_{提取} \times V_{样本}) \div T = 0.625 \times \Delta A \div \Delta A_{标准}$$

C标准：标准溶液浓度，0.625μmol/mL；V酶促：酶促反应总体积，0.1mL；V样：加入样本体积，0.02mL；V提取：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，10min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万；1000：单位换算系数，1μmol=1000nmol。

注意事项：

- 1、 建议将样本用提取液稀释后再进行测定，并在计算公式中乘以稀释倍数。
- 2、 若A大于1.5或者显色完成后有沉淀产生，将上清液或者粗酶液用蒸馏水稀释后再进行测定。
- 3、 定磷试剂应现配现用，正常颜色为浅黄色，如有变色或变蓝则均为失效。

实验实例：

- 1、 取 0.1g 稗草加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得 A 测定管=0.254、A 对照管=0.171、A 空白管=0.047、A 标准管=0.357，计算 $\Delta A = A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管} = 0.254 - 0.171 = 0.083$ ， $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管} = 0.357 - 0.047 = 0.31$ ，按样本质量计算酶活得：

$$G6P \text{ (U/g 质量)} = 312.5 \times \Delta A \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 312.5 \times 0.083 \div 0.31 \div 0.1 = 836.6935 \text{ U/g 质量。}$$

- 2、 取 0.1g 小鼠肝脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得 A 测定管=0.995、A 对照管=0.384、A 空白管=0.047、A 标准管=0.357，计算 $\Delta A = A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管} = 0.995 - 0.384 = 0.611$ ， $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管} = 0.357 - 0.047 = 0.31$ ，按样本质量计算酶活得：

$$G6P \text{ (U/g 质量)} = 312.5 \times \Delta A \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 312.5 \times 0.611 \div 0.31 \div 0.1 = 6159.274 \text{ U/g 质量。}$$

- 3、 取 0.1g 小鼠血清稀释 2 倍，直接检测，用 96 孔板测得 A 测定管=0.38、A 对照管=0.199、A 空白管=0.047、A 标准管=0.357，计算 $\Delta A = A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管} = 0.38 - 0.199 = 0.181$ ， $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管} = 0.357 - 0.047 = 0.31$ ，按血清计算酶活得：

$$G6P \text{ (U/mL)} = 312.5 \times \Delta A \div \Delta A \text{ 标准} \times \text{稀释倍数} = 312.5 \times 0.181 \div 0.31 \times 2 = 364.9194 \text{ U/mL。}$$

相关发表文献：

[1] Fan X, Hou T, Jia J, et al. Discrepant dose responses of bisphenol A on oxidative stress and DNA methylation in grass carp ovary cells[J]. Chemosphere, 2020, 248: 126110.

相关系列产品：

BC0730/BC0735 丙酮酸羧化酶（PC）活性检测试剂盒

BC0920/BC0925 果糖-1,6-二磷酸（酯）酶（FBP）活性检测试剂盒

流程图：（见下页）

