

3-磷酸甘油酯酶（GPP）活性测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-T023 微板法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

3-磷酸甘油酯酶（GPP，EC3.1.3.21）催化 3-磷酸甘油脱下磷酸根离子形成甘油，是甘油合成过程中的最后一步酶促反应，该酶活性的高低直接决定甘油的生成水平。

本试剂盒采用 3-磷酸甘油为底物，用钼酸铵显色剂测定单位时间内酶催化产生的磷酸根离子的量，进而得出 3-磷酸甘油酯酶的活性大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	-20℃ 避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 6mL 蒸馏水溶解备用； 3. 用不完的试剂-20℃ 分装保存。
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	A:粉体 1 瓶 B:液体 3mL×1 瓶	4℃ 避光保存	1. 临用前在试剂 A 中加 2.86mL 的 B 液，再加 22.14mL 的蒸馏水，混匀溶解备用。 2. 用不完的试剂 4℃ 保存，需避光，现配现用，变蓝色不能使用。
标准品	粉体 1 支	4℃ 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。

【注】：全程操作需无磷环境；试剂配置最好用新的枪头和玻璃移液器等，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

三、实验器材：

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）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、α-磷酸甘油酯酶（GPP）活性测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：

取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g）到研钵内，加入 1mL 提取液，在冰上进行冰浴匀浆或者液氮研磨。12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

[注]：也可以按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例提取。

② 细菌/真菌样本：

先收集细菌/真菌到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌/真菌加入 1mL 提取液；冰浴超声波破碎细菌/真菌（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm，4℃ 离心 10min，

取上清，置冰上待测。

[注]：也可按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：澄清的液体样本直接检测，若浑浊则离心后取上清液检测。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 700nm。

② 在 EP 管中依次加入下列试剂：

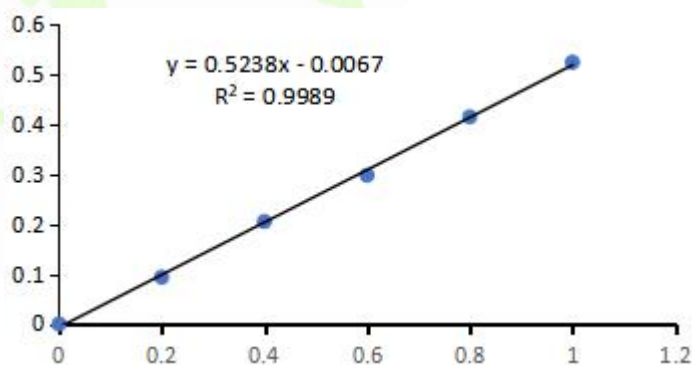
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	50	
提取液	50	50
试剂一	50	50
混匀，37℃孵育 30min。		
试剂二	50	50
样本		50
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，取上清待测。		

③ 显色反应，在 96 孔板中加入：

上清液	50	50
试剂三	200	200
混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-A 对照（每个样本做一个自身对照）。		

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.5238x - 0.0067$ ，x 是标准品摩尔质量（ $\mu\text{mol/mL}$ ），y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白分解底物产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0067) \div 0.5238 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 15.27 \times (\Delta A + 0.0067) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织分解底物产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0067) \div 0.5238 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 15.27 \times (\Delta A + 0.0067) \div W$$

4、按细菌或细胞密度计算：

定义：每小时每 1 万个细菌或细胞分解底物产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0067) \div 0.5238 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.031 \times (\Delta A + 0.0067)$$

5、按液体体积计算：

定义：每小时每毫升液体分解底物产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0067) \div 0.5238 \times V_2] \div V_1 \div T = 15.27 \times (\Delta A + 0.0067)$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.05mL ;

V2---酶促反应总体积, 0.2mL;

T---反应时间, 1/2 小时;

W---样本鲜重, g;

500---细菌或细胞总数, 500 万。

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 标准品用 10mL 蒸馏水溶解, 标准品母液浓度为 $5\mu\text{mol/mL}$ 。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, $1\mu\text{mol/mL}$ 。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:

吸取标准品母液 200uL, 加入 800uL 蒸馏水, 混匀得到 $1\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	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 依据显色反应阶段测定管加样表操作, 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	50	
蒸馏水		50
试剂三	200	200
混匀, 室温静置 3min, 700nm 下读取各管吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。		