

葡萄糖-6-磷酸酶 (G6Pase)活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TYS002 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×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 15mL×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、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、葡萄糖-6-磷酸酶 (G6Pase)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: 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°C 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、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 设置温度 25°C, 调节波长至 450nm。
- ② 试剂解冻至室温 (25°C); 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 μ L, 其他试剂加样量不变
- ③ 在 96 孔板中依次加入:

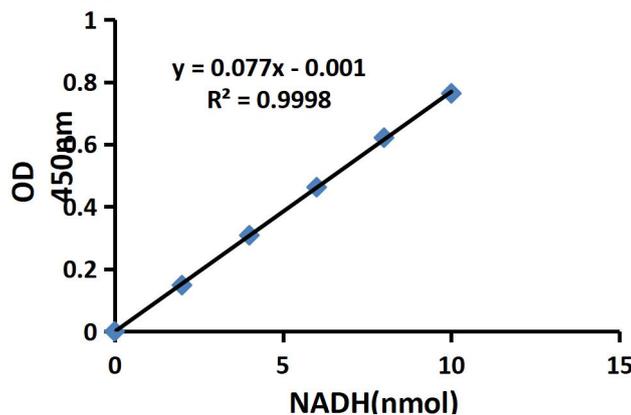
试剂组分 (μ L)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	10
试剂五	150
混匀, 25°C 条件下, 立即于 450nm 处读取 A1 值, 20min 后读取 A2 值, (观察: 酶活性越大, 则黄色越明显)。 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【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°C 煮沸 10min, 室温离心, 取上清液测定), 其他不变。 $\Delta A = A2$ 测定 - A2 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。

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

- 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。

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

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。

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

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/μL)：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/μL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照 10μL 标准品+10μL 试剂四+180μL 试剂五加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。