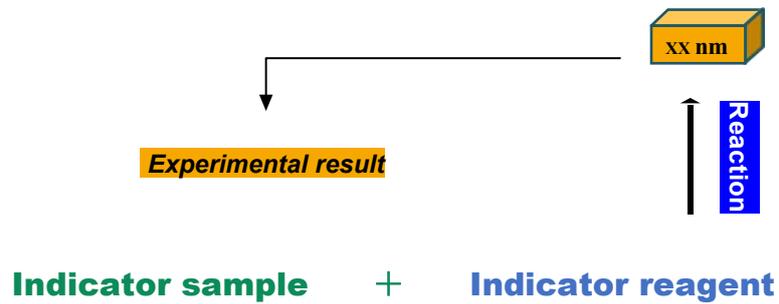


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

葡萄糖-6-磷酸酶 (G6P) 试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose 6 phosphatase, G6Pase, EC 3.1.3.9) 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。

测定原理：

G6P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，在340nm下测定NADH生成速率，即可反映G6P活性。

需自备的仪器和用品：

分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	100mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体 19 mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1支	-20℃保存	
试剂三	粉剂×1支	-20℃保存	
试剂四	试剂×1支	-20℃保存	

样本的前处理：

- 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℃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) 样品：直接检测。

测定步骤：

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。

工作液的配制：临用前将试剂二、试剂三和试剂四转移到试剂一中混合溶解待用；用不完的试剂4℃保存一周；

- 2、将工作液置于37℃ (哺乳动物) 或25℃ (其它物种) 预热5分钟。

- 3、在微量石英比色皿或96孔板中加入10 μL样本和190 μL工作液，立即混匀，记录340nm处初始吸光值A1和2min后的吸光值A2，计算ΔA=A2-A1。

注意：在该试剂盒中，若 ΔA 大于0.3，需将样本用提取液稀释适当倍数后测定，使 ΔA 小于0.3可提高检测灵敏度。计算公式中乘以相应稀释倍数。

G6P 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、血清（浆）G6P 活力计算

单位定义：每毫升血清（浆）每分钟生成1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6P (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

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 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6P (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1608 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每g组织每分钟生成1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6P (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

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

$$\text{G6P (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.215 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；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。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1、血清（浆）G6P 活力计算

单位定义：每毫升血清（浆）每分钟生成1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6P (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 3216 \times \Delta A$$

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 NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6P (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 3216 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每g组织每分钟生成1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6P (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每1万个细胞或细胞每分钟生成1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6P (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6.43 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；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。