

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0813

Size: 50T/48S

葡萄糖-6-磷酸酶 (G6P) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	60mL × 1 瓶	4℃ 保存	—
试剂一	液体 47.5 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	液体 × 1 支	-20℃ 保存	—

五、操作步骤：

● 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（ 10^4 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1mL石英比色皿中加入50 μ L样本和950 μ L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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

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。

六、G6P 活性计算：

1、血清（浆）G6P 活力计算

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

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

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。

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

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每g 组织每分钟生成1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

(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1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

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。