

葡萄糖-6-磷酸酶 (G6P) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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:

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。

试剂的组成和配制:

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: 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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、**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; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
- 3、将工作液置于 37℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种)预热 5 分钟。
- 4、在 1mL 石英比色皿中加入 50 μL 样本和 950 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 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

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:
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。

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

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。

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

(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。

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

(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 1 nmol 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。