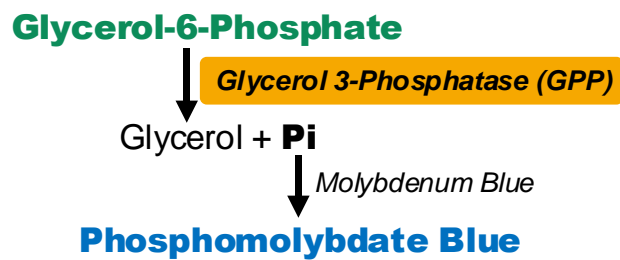




3-磷酸甘油酯酶 (GPP) 活性检测试剂盒
Glycerol 3-Phosphatase (GPP) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



3-磷酸甘油酯酶 (GPP) 活性检测试剂盒

Glycerol 3-Phosphatase (GPP) Activity Assay Kit

一、产品描述

3-磷酸甘油酯酶是甘油代谢途径中的关键酶，其主要功能是催化 3-磷酸甘油酸脱去磷酸根离子生成甘油，其活性直接影响甘油的生成水平，在甘油代谢调控机制、代谢紊乱类疾病诊断和药物靶点筛选等研究领域具有重要意义。

3-磷酸甘油酯酶能够 3-磷酸甘油分解生成甘油和无机磷，无机磷在酸性条件下能够与钼酸铵反应生成磷钼酸铵，经还原后生成蓝色磷钼蓝，产物在 660 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征 3-磷酸甘油酯酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 8 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 900 μL×1 支	4°C 保存	-
试剂三	液体 1.5 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂四	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 4 mL 蒸馏水充分溶解 (配制后 4°C 可保存 1 个月)
试剂五	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 4 mL 蒸馏水充分溶解 (配制后 4°C 可保存 1 个月)
试剂六	液体 4 mL×1 瓶	4°C 保存	-
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C 保存	10 μmol/mL 磷标准液
标准稀释液的制备 (现用现配): 使用前将 10 μmol/mL 磷标准液使用蒸馏水稀释至 1.2、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05 μmol/mL 即为标准稀释液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 酶标仪、96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，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 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，总时间 3 min），4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：直接测定或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 660 nm。

②试验前将试剂一置于 37℃ 预热 10 min 以上；

③定磷剂的配制（现用现配）：根据使用量按试剂四：试剂五：试剂六：蒸馏水=1:1:1:2 的体积比配制，充分混匀即为定磷剂。注：定磷剂正常应为浅黄色，若无色则试剂失效，若蓝色则为磷污染。

④在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	对照组 (μL)	标准组 (μL)	空白组 (μL)
粗酶液	15	-	-	-
试剂一	60	75	-	-
试剂二	15	-	-	-
充分混匀，37℃ 反应 30 min				
试剂三	10	10	-	-
粗酶液	-	15	-	-
充分混匀，10000 g 常温离心 5 min，取上清液				
在 96 孔板中依次加入下列试剂：				
上清液	40	40	-	-
标准稀释液	-	-	40	-
蒸馏水	-	-	-	40
定磷剂	160	160	160	160
充分混匀，37℃ 反应 30 min，冷却至室温				

吸光值测定：测定 660 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照， ΔA 标准 = A 标准 - A 空白。注：每个样品均需设一个对照组，各浓度标准组和空白组只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 1.2、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05 $\mu\text{mol/mL}$ 为横坐标 (x)，以其对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y)，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

3.3-磷酸甘油酯酶 (GPP) 活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每小时催化生成 1 μmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPP (U/mg prot)} = \frac{x \times V_{\text{酶促}} \times D}{C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{13.33 \times x \times D}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每小时催化生成 1 μmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPP (U/g)} = \frac{x \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{样总}} \times D}{W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{13.33 \times x \times D}{W}$$

③按照细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每小时催化生成 1 μmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPP (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{x \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{样总}} \times D}{\text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{13.33 \times x \times D}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每小时催化生成 1 μmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPP (U/mL)} = \frac{x \times V_{\text{酶促}} \times D}{V_{\text{样}} \times T} = 13.33 \times x \times D$$

注释：V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.015 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；V 酶促：酶促反应体系总体积，0.1 mL；C_{pr}：粗酶液蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，0.5 h；D：粗酶液稀释倍数，若未稀释则为 1。

四、注意事项

①若 A 测定或 ΔA 测定大于 1.0，建议将粗酶液使用适当稀释或缩短酶促反应时间（第一次 37°C 反应时间）后再进行测定；若 ΔA 测定小于 0.02，建议适当增加样本量或延长酶促反应时间（第一次 37°C 反应时间）后再进行测定，计算时相应修改；

②测定所用器皿要求严格无磷，最好使用新的玻璃器皿或一次性塑料器皿，避免磷污染；

③为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

