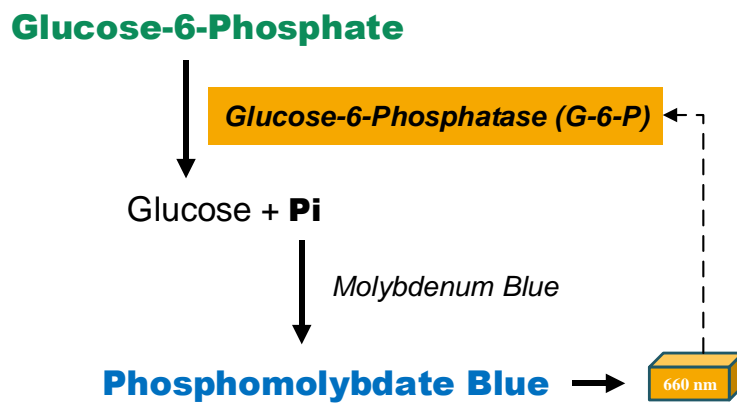




葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-P) 活性检测试剂盒
Glucose-6-Phosphatase (G-6-P) Activity Assay Kit



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



葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-P) 活性检测试剂盒

Glucose-6-Phosphatase (G-6-P) Activity Assay Kit

一、产品描述

葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-P) 是一种水解磷酸化合物的磷酸酶, 广泛存在于动植物、微生物和细胞中, 作为糖异生过程水解葡萄糖-6-磷酸生成葡萄糖过程中的限制酶, 能够保持血糖的动态平衡, 并且在糖代谢异常引起的疾病诊断方面具有重要意义。

葡萄糖-6-磷酸酶能够催化葡萄糖-6-磷酸生成葡萄糖和无机磷, 利用钼蓝法测定无机磷含量: 钼蓝与无机磷反应生成磷钼蓝, 产物在 660 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可表征葡萄糖-6-磷酸酶的活性。

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 12 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂二	粉剂×2 瓶	4°C保存	使用前每瓶试剂二中加入 5 mL 试剂一充分溶解 (可分装后-20°C保存, 严禁反复冻融)
试剂三	粉剂×1 瓶	4°C保存	使用前加入 4 mL 蒸馏水充分溶解
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
试剂五	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 标准磷贮备液
定磷剂的配制 (现用现配): 按试剂三: 试剂四: 试剂五: 蒸馏水=1:1:1:2 的体积比配制。 (定磷剂应为浅黄色, 若变色则试剂失效, 若是蓝色则为磷污染)			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/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 0.1g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 8000 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 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），4℃ 8000 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：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 660 nm，蒸馏水调零。

②标准应用液的制备：将 10 $\mu\text{mol/mL}$ 标准磷贮备液使用蒸馏水稀释 16 倍至 0.625 $\mu\text{mol/mL}$ 。

③在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
粗酶液	20	20	-	-
试剂二	80	-	-	-
37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确反应 10 min 反应结束后迅速放入沸水处理 10 min，冷却至室温				
试剂二	-	80	-	-
10000 rpm 常温离心 10 min，取上清				
上清液	25	25	-	-
标准应用液	-	-	25	-
定磷剂	125	125	125	125
蒸馏水	100	100	100	125
充分混匀，40℃反应 10 min				

吸光值测定：吸取 200 μL 反应液于 96 孔板或微量玻璃比色皿中，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：每个测定管均需设一个对照管，空白管只需测定 1-2 次。

3. 葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-P) 活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{G-6-P (U/mg prot)} = \frac{C \text{ 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \times V \text{ 酶促} \times 1000}{\Delta A \text{ 标准} \times C_{\text{pr}} \times V \text{ 样} \times T} = \frac{312.5 \times \Delta A \text{ 测定}}{C_{\text{pr}} \times \Delta A \text{ 标准}}$$

②按组织样本质量计算

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

$$\text{G-6-P (U/g)} = \frac{C \text{ 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \times V \text{ 酶促} \times V \text{ 提取} \times 1000}{\Delta A \text{ 标准} \times W \times V \text{ 样} \times T} = \frac{312.5 \times \Delta A \text{ 测定}}{W \times \Delta A \text{ 标准}}$$

③按细菌或细胞数量计算

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

$$\text{G-6-P (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{C \text{ 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \times V \text{ 酶促} \times V \text{ 提取} \times 1000}{\Delta A \text{ 标准} \times 500 \times V \text{ 样} \times T} = \frac{0.625 \times \Delta A \text{ 测定}}{\Delta A \text{ 标准}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol 无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{G-6-P (U/mL)} = \frac{C \text{ 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \times V \text{ 酶促} \times 1000}{\Delta A \text{ 标准} \times V \text{ 样} \times T} = \frac{312.5 \times \Delta A \text{ 测定}}{\Delta A \text{ 标准}}$$

注释： C 标准：标准应用液浓度，0.625 $\mu\text{mol/mL}$ ；V 酶促：酶促反应总体积，0.1 mL；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V 提取：粗酶液总体积，1 mL；T：反应时间，10 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，以万计；1000：单位换算系数，1 $\mu\text{mol}=1000 \text{ nmol}$ 。

四、注意事项

- ①若 A 测定大于 1.5 或反应完成后有沉淀生成时，建议将粗酶液或上清液使用蒸馏水稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ②定磷剂应现配现用，正常颜色为浅黄色，如有变色或变蓝则均为失效；
- ③测定所用试管或离心管等试验器材均要求严格无磷，可使用一次性塑料器皿，避免磷污染；
- ④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.

