葡萄糖-6-磷酸酶（G6Pase)活性测定试剂盒说明书

(货号：G0557F 分光法 48 样)

一、产品简介：

葡萄糖-6-磷酸酶（(glucose 6 phosphatase，G6Pase，EC 3.1.3.9）主要存在于肝脏、肾 脏、小肠粘膜细胞、胰岛细胞中，催化 6-磷酸葡萄糖水解为葡萄糖的关键酶，该反应是糖原分解和糖异生的最后一步反应。在保证血糖的动态平衡方面起着重要的作用。

本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法：G6Pase 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，NADH 与一种显色探针反应生成有色物质，通过检测该有色物质的增加速率即可计算出 G6Pase 酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	用前甩几下使粉剂落入底部，再加 1.2mL 蒸馏水充分溶解，
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下使粉剂落入底部，再加 1.2mL 蒸馏水充分溶解，
试剂三	液体μL×1 支	-20℃保存	用前甩几下使液体落入底部，再加 1.2mL 蒸馏水充分溶解，
试剂四	液体 1mL×1 支	4℃保存	
试剂五	液体 34mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、葡萄糖-6-磷酸酶（G6Pase)活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取

② 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；取约 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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10^4）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，设置温度 25℃,调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

② 试剂解冻至室温（25℃）；若一次检测样本数较多，可将试剂一和二和三等比例混匀后再一起加 60μL，其他试剂加样量不变。

③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	40
试剂一	20

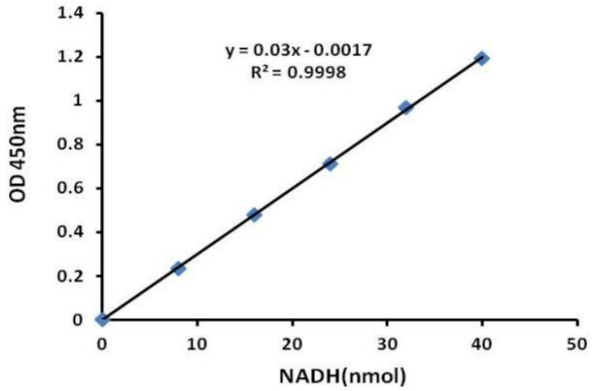
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	20
试剂五	680
混匀，25℃条件下，立即于 450nm 处读取 A1 值，20min 后读取 A2 值，（观察：酶活性越大，则黄色越明显）。ΔA=A2-A1。	

【注】：1.若ΔA 过小，可以延长反应时间（如：60min 或更长）再读取 A2，或增加样本加样体积 V1（如增至 70μL，则试剂五相应减少），则改变后的反应时间 T 和加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

2.若样本自身含有较高水平葡萄糖，为了消除样本自身的背景值，需增设一个样本自身对照，即对照管换成 40μL 的煮沸样本（95-100℃煮沸 10min,室温离心，取上清液测定），其他不变。ΔA= A2 测定- A2 对照。

五、结果计算：

1、标准曲线：y = 0.03x - 0.0017；x 是 NADH 摩尔质量（nmol），y 是ΔA。



2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化 1 nmolNAD$^+$生成 1nmol NADH 定义为一个酶活单位。

G6Pase(nmol/min /mg prot)=[(ΔA+0.0017)÷0.03]÷(V1×Cpr)÷T=41.67×(ΔA+0.0017)÷Cpr

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟催化 1 nmolNAD$^+$生成 1nmol NADH 定义为一个酶活单位。

G6Pase(nmol/min/g 鲜重)=[(ΔA+0.0017)÷0.03]÷(W×V1÷V)÷T=41.67×(ΔA+0.0017)÷W

4、按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细胞/细胞每分钟催化 1nmolNAD$^+$生成 1nmol NADH 定为一个酶活单位。

G6Pase(nmol/min/10^4 cell)=[(ΔA+0.0017)÷0.03]÷(500×V1÷V)÷T=0.08×(ΔA+0.0017)

V----加入提取液体积，1 mL；　　V1----加入样本体积，0.04mL；

W----样本质量，g。　　T----反应时间，20 min；

Cpr----样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1 制备标准品母液（1nmol/μL）：向标准品 EP 管里面加入 1.41mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存）。

2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/μL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3 按照 40μL 标准品+20μL 试剂四+680μL 试剂五加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。