

Glucose-6-phosphatase Activity Assay Kit

葡萄糖-6-磷酸酶 (G6Pase)活性测定试剂盒说明书

货号: G0557W | 方法: 微板法 | 规格: 96 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 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4°C保存	使用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解,
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	使用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解,
试剂三	液体 μL ×1 支	-20°C保存	使用前甩几下使液体落入底部, 再加 1mL 蒸馏水充分溶解,
试剂四	液体 1mL×1 支	4°C保存	
试剂五	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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°C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°C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 酶标仪预热 30min 以上, 设置温度 25°C, 调节波长至 450nm。

② 试剂解冻至室温 (25°C); 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 30 μL , 其他试剂加样量不变。

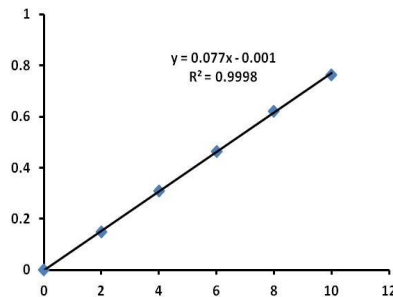
③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	10
试剂五	150
混匀, 25°C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。	

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调; 针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.077x - 0.001$; x 是 NADH 摩尔质量 (nmol), y 是 ΔA。



标准曲线示意图

说明: 标准曲线由标准品测定获得, 具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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。

$$G6Pase(nmol/min/mg\ prot) = [(\Delta A + 0.001) \div 0.077] \div (V1 \times Cpr) \div T = 64.94 \times (\Delta A + 0.001) \div Cpr$$

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。

$$G6Pase(nmol/min/g\ 鲜重) = [(\Delta A + 0.001) \div 0.077] \div (W \times V1 \div V) \div T = 64.94 \times (\Delta A + 0.001) \div W$$

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。

$$G6Pase(nmol/min/10^4\ cell) = [(\Delta A + 0.001) \div 0.077] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.13 \times (\Delta A + 0.001)$$

V----加入提取液体积, 1 mL;

V1----加入样本体积, 0.01mL;

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。