

葡萄糖-6-磷酸酶 (G6P)检测试剂盒 (分光光度法)

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

提取液：100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 19 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、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。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。
- 2、将工作液置于 37℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种)预热 5 分钟。
- 3、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μL 样本和 190μL 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 $\Delta A=A2-A1$ 。

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：

a 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

- 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。

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

(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；

d：比色皿光径，1cm；

V 样总：加入提取液体积，1 mL；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；

500：细菌或细胞总数，500 万。

ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；

V 样：加入样本体积，0.05 mL；

T：反应时间，2 min；

W：样本质量，g；

a. 用 96 孔板测定的计算公式如下

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。

$$\text{G6P (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T \\ = 3216 \times \Delta A$$

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。

$$\text{G6P (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ = 3216 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{G6P (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 3216 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细胞或细胞每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6P (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 6.43 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L；

d：96 孔板光径，0.5cm；

V 样总：加入提取液体积，1 mL；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；

500：细菌或细胞总数，500 万。

ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；

V 样：加入样本体积，0.01 mL；

T：反应时间，2 min；

W：样本质量，g；