

## 葡萄糖-6-磷酸酶（G6P）检测试剂盒（紫外分光光度法）

产品货号：BA1250

产品规格：50管/24样

### 产品简介：

葡萄糖-6-磷酸酶（glucose 6 phosphatase, G6Pase, EC3.1.3.9）是一种水解磷酸化化合物的磷酸酶，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。

G6P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的增加，即可反映G6P活性。

**注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体40mL×1瓶	4℃
试剂一	液体12mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×2瓶	4℃
试剂三	粉剂×1瓶	4℃
试剂四	粉剂×1瓶	4℃
试剂五	液体8mL×1瓶	4℃
标准品	液体1mL×1支	4℃

### 溶液的配制：

1. 试剂三：临用前用8mL蒸馏水溶解备用。
2. 试剂四：临用前用8mL蒸馏水溶解备用。
3. 标准品：10 $\mu$ mol/mL磷标准液。临用前用蒸馏水稀释16倍至0.625 $\mu$ mol/mL的标准溶液备用。
4. 工作液的配制：试剂二中加入5mL试剂一充分溶解备用。可以将工作液分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
5. 定磷试剂的配制：按H<sub>2</sub>O:试剂三:试剂四:试剂五（V:V:V:V）=2:1:1:1的比例配制，配好的定磷剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂现用现配。

**注意：**配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、低温台式离心机、水浴锅、1mL玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、EP管、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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（10<sup>4</sup>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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

3. 血清（浆）样本：直接检测。

## 二、测定步骤

1. 分光光度计预热30min以上，调节波长至660nm，蒸馏水调零。
2. 操作表：在1.5mlEP管中进行下列操作：

	测定管	对照管	标准管	空白管
样本（ $\mu\text{L}$ ）	40	40		
工作液（ $\mu\text{L}$ ）	160			
充分混匀，37℃（哺乳动物）或者25℃（其他物种）水浴反应10min。反应后迅速放入沸水中沸水浴10min。取出冷却至常温				
工作液（ $\mu\text{L}$ ）	-	160		
10000rpm常温离心10min后取上清。				
上清液（ $\mu\text{L}$ ）	100	100	-	-
标准溶液（ $\mu\text{L}$ ）	-	-	100	-
定磷试剂（ $\mu\text{L}$ ）	500	500	500	500
蒸馏水（ $\mu\text{L}$ ）	400	400	400	500
充分混匀，40℃反应10min测定660nm处吸光值，测定管、对照管、空白管、标准管测定的吸光度分别记为A测定管、A对照管、A空白管、A标准管。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。				

## 三、G6P活性计算

1. 血清（浆）G6P活力计算

单位定义：每mL血清（浆）每分钟生成1nmol无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6P (U/mL)} = \Delta A \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times 1000 \times V_{\text{酶促}} \div V_{\text{样本}} \div T = 312.5 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}}$$

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无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6P (U/mg prot)} = \Delta A \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times 1000 \times V_{\text{酶促}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 312.5 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算：

单位定义：每g组织每分钟生成1nmol无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6P (U/g质量)} = \Delta A \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times 1000 \times V_{\text{酶促}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 312.5 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

(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1nmol无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6P (U/10}^4\text{cell)} = \Delta A \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times 1000 \times V_{\text{酶促}} \div (500 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 0.625 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}}$$

C标准：标准溶液浓度，0.625 $\mu\text{mol/mL}$ ；V酶促：酶促反应总体积，0.2mL；V样：加入样本体积，0.04mL；V提取：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，10min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万；1000：单位换算系数，1 $\mu\text{mol}=1000\text{nmol}$ 。

### 注意事项：

1. 建议将样本用提取液稀释后再进行测定，并在计算公式中乘以稀释倍数。
2. 若A大于1或者显色完成后有沉淀产生，将上清液或者粗酶液用蒸馏水稀释后再进行测定。
3. 定磷试剂应现配现用，正常颜色为浅黄色，如有变色或变蓝则均为失效。

### 实验实例：

1. 取0.1g小鼠肌肉组织加入1mL提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，测得A测定管=0.913、A对照管=0.869、A空白管=0.014、A标准管=0.509，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.913 - 0.869 = 0.044$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} = 0.509 - 0.014 = 0.495$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{G6P (U/g质量)} = 312.5 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 312.5 \times 0.044 \div 0.495 \div 0.1 = 277.7778 \text{ U/g质量。}$$



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

2. 取0.1g稗草加入1mL提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，测得A测定管=0.379、A对照管=0.237、A空白管=0.014、A标准管=0.509，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.379 - 0.237 = 0.142$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} = 0.509 - 0.014 = 0.495$ ，按样本质量计算酶活得：  
G6P (U/g质量) =  $312.5 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 312.5 \times 0.142 \div 0.495 \div 0.1 = 896.4646$  U/g质量。

#### 相关发表文献：

[1] Fan X, Hou T, Jia J, et al. Discrepant dose responses of bisphenol A on oxidative stress and DNA methylation in grass carp ovary cells[J]. Chemosphere, 2020, 248: 126110.



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com