

## 葡萄糖-6-磷酸酶 (G6P)试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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  $\text{NAD}^+$  还原生成 NADH, 在 340nm 下测定 NADH 生成速率, 即可反映 G6P 活性。

### 需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

### 试剂的组成和配制:

提取液: 60mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 47.5 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 ( $10^4$  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 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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

2、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。

3、将工作液置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 5 分钟。

4、在 1mL 石英比色皿中加入 50  $\mu$ L 样本和 950  $\mu$ L 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  $\Delta A$  大于 0.3, 需将样本用提取液稀释适当倍数后测定, 使  $\Delta A$  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:

#### 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。

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

##### (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， $1 \times 10^{-3}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol /cm；d：

比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：

反应时间，2 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，500 万。