葡萄糖-6-磷酸酶（G6P)试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注　意 ：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 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：

分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

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（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 ΔA=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。

G6P（nmol/min/mL））＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷V 样÷T=1608×ΔA

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。

G6P（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T=1608×ΔA÷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。

G6P（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W ×V 样÷V 样总)÷T=1608×ΔA÷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。

G6P（nmol/min/10^4 cell）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=3.215×ΔA

V 反总：反应体系总体积，1×10^{-3} L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 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。

b.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。

G6P（nmol/min/mL））＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷V 样÷T=3216×ΔA

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。

G6P（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T=3216×ΔA÷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。

G6P（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W ×V 样÷V 样总)÷T=3216×ΔA÷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。

G6P（nmol/min/10^4 cell）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=6.43×ΔA

V 反总：反应体系总体积，2×10^{-4} L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 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。