

## 3-磷酸甘油酯酶 (GPP) 活性测定试剂盒

分光法 24 样

### 产品简介:

3-磷酸甘油酯酶 (GPP, EC3.1.3.21) 催化 3-磷酸甘油脱下磷酸根离子形成甘油, 是甘油合成过程中的后一步酶促反应, 该酶活性的高低直接决定甘油的生成水平。

本试剂盒采用 3-磷酸甘油为底物, 用钼酸铵显色剂测定单位时间内酶催化产生的磷酸根离子的量, 进而得出 3-磷酸甘油酯酶的活性大小。

### 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 35mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 临用前加 3.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂 4℃保存。
试剂二	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	A: 粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前在试剂 A 中加 2.7mL 的 B 液, 再加 34.8mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用。用不完的试剂 4℃保存, 若试剂变色则舍弃。
	B: 液体 3mL×1 瓶		
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

**[注]:** 全程操作需无磷环境; 试剂配置好用新的枪头和玻璃移液器等, 也可以用一次性塑料器皿, 免磷污染。

## 所需的仪器和用品:

分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、可调试移液器、台式离心机、水浴锅、研钵、冰。

## $\alpha$ -磷酸甘油酯酶 (GPP) 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:

取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g) 到研钵内, 加入 1mL 提取液, 在冰上进行冰浴匀浆或者液氮研磨。12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

**[注]:** 也可以按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取。

#### ② 细菌/真菌样本:

先收集细菌/真菌到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌/真菌加入 1mL 提取液;

冰浴超声波破碎细菌/真菌 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次);

12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

**[注]:** 也可按照细菌或细胞数量 ( $10^4$ 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取)。

#### ③ 液体样本:

澄清的液体样本直接检测, 若浑浊则离心后取上清液检。

### 2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 700nm, 蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入下列试剂:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	60	60
提取液	60	60
试剂一	60	60
试剂二	60	60
试剂三		60
混匀, 12000rpm, 4°C 离心 5min, 取上清待测。		

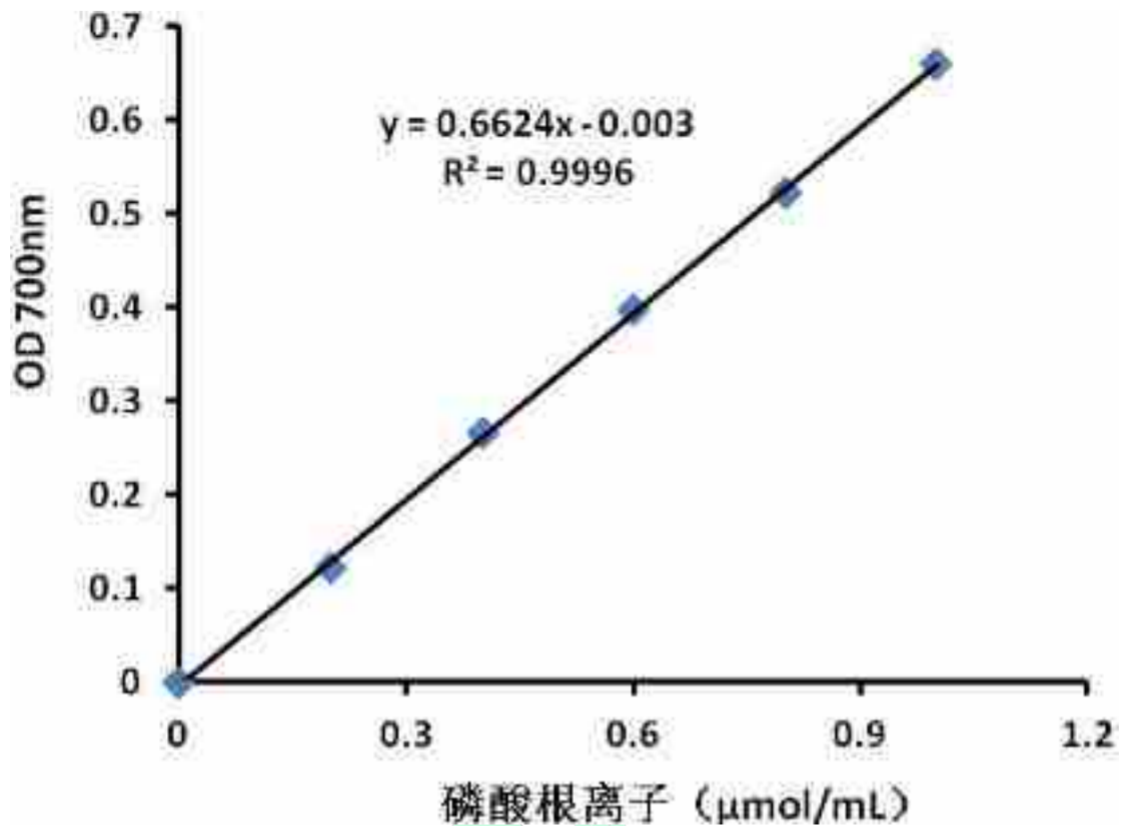
③ 显色反应, 在 EP 管中加入:

上清液	150	150
试剂三	600	600
混匀, 室温静置 3min, 全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm), 700nm 下读取各管吸光值 A, $\Delta A = A - A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

### 结果计算:

#### 1、标准曲线方程:

$y = 0.6624x - 0.003$ , x 是标准品摩尔质量 (μmol/mL), y 是 $\Delta A$



## 2、按蛋白浓度计算:

定义: 每小时每 1 万个细菌或细胞分解底物产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{cell}) = [(\Delta A + 0.003) \div 0.6624 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.024 \times (\Delta A + 0.003)$$

每小时每毫克组织蛋白分解底物产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.003) \div 0.6624 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 12.08 \times (\Delta A + 0.003) \div \text{Cpr}$$

## 3、按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织分解底物产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.003) \div 0.6624 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 12.08 \times (\Delta A + 0.003) \div W$$

#### 4、按细菌或细胞密度计算：

定义：每小时每 1 万个细菌或细胞分解底物产生 1 $\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h} / 10$$

$$4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.003) \div 0.6624 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.024 \times (\Delta A + 0.003)$$

#### 5、按液体体积计算：

定义：每小时每毫升液体分解底物产生 1 $\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.003) \div 0.6624 \times V_2] \div V_1 \div T = 12.08 \times (\Delta A + 0.003)$$

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入样本体积，0.06mL；

V2---酶促反应总体积，0.24mL； T---反应时间，1/2 小时；

W---样本鲜重，g； 500---细菌或细胞总数，500 万。

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。

#### 附：标准曲线制作过程：

1. 制备标准品母液 (5 $\mu\text{mol/mL}$ )：标准品用 10mL 试剂一溶解。(母液需在两天内用)。
2. 把母液稀释成六个浓度：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.  $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
3. 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线