

葡萄糖-6-磷酸酶 (G6P) 检测试剂盒 (NADH 速率法/微量法)

货号: PMK1234

保存: -20°C 避光保存 12 个月

规格: 48T/96T

适用样本: 动植物组织、细胞、真菌、细菌、血清(浆)等液体样本

产品简介

葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose 6 phosphatase, G6Pase, EC 3.1.3.9) 是一种水解磷酸化合物的磷酸酶, 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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法, 用于检测生物样本中 G6P 的活性。其原理是 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。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4°C 保存
试剂一	10mL	20mL	4°C 保存
试剂二	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20°C 保存
试剂三	60 μL	120 μL	-20°C 保存
试剂四	10 μL	20 μL	-20°C 保存

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计 (能测 340nm 处的吸光度) 及恒温箱

96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头

低温离心机、制冰机

去离子水

匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

注意: 小管试剂开盖前, 请先低速离心。

提取液: 即用型; 4°C 保存。

试剂一: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

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°C 保存, 避免反复冻融。

样本制备

动植物组织: 称取约 0.1g 样本, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆。8,000g, 4°C 离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

细胞或细菌: 收集 500 万细胞或细菌到离心管内, 用冷 PBS 清洗细胞或细菌, 离心后弃上清, 加入 1mL 提取液, 冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min (功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 7s, 重复 30 次), 然后 8,000g, 4°C 离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

血清等液体样本: 直接测定。

产品说明书

注意：1. 推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存1个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用BCA法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计去离子水调零。
2. 工作液置于25℃（一般物种）或者37℃（哺乳动物）孵育10min。
3. 样本测定：在96孔UV微孔板或微量石英比色皿中加入10μL样本和190μL工作液，立即混匀。记录340nm处初始吸光值 A_1 和2min后的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

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 ΔA 小于0.001可适当加大样本量。如果 ΔA 大于0.5，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。

结果计算

A. 使用96孔UV板测定的计算公式如下

1. 按样本鲜重计算：

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟生成1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$G6P(U/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 3215 \times \Delta A \div W$$

2. 按液体样本体积计算：

单位的定义：每mL液体样本在反应体系中每分钟生成1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$G6P(U/mL) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 3215 \times \Delta A$$

3. 按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每 10^4 个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$G6P(U/10^4 \text{ Cells}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 3215 \times \Delta A \div 500 = 6.43 \times \Delta A$$

4. 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟生成1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$G6P(U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div Cpr$$

$V_{\text{反应}}$ ：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； 10^9 ： $1\text{mol}=1 \times 10^9 \text{nmol}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，2min； W ：样品质量，g； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细菌或细胞总数， 5×10^6 。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d ：0.5cm调整为 d ：1cm进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1233 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（PEPCK）检测试剂盒（微量法）

PMK1235 果糖-1,6-二磷酸酶（FBP）/果糖-1,6-二磷酸酯酶检测试剂盒（NADPH速率法）

PMK1236 丙酮酸羧化酶（PC）检测试剂盒（NADH速率法）

PMK1885 丙酮酸羧化酶（PC）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

