



葡萄糖-6-磷酸酶（G6P）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：BC3320

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

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

溶液的配制：

- 1、试剂三：临用前用 8 mL 蒸馏水溶解备用。
- 2、试剂四：临用前用 8 mL 蒸馏水溶解备用。
- 3、标准品：10 μmol/mL 磷标准液。临用前用蒸馏水稀释 16 倍至 0.625 μmol/mL 的标准溶液备用。
- 4、工作液的配制：试剂二中加入 5 mL 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 H₂O: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、玻璃棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

产品说明：

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。

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。

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（10⁴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1.5ml EP管中进行下列操作：

	测定管	对照管	标准管	空白管
样本（μL）	40	40	-	-
工作液（μL）	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（μL）	-	160		
10000rpm常温离心10min后取上清。				
上清液（μL）	100	100	-	-
标准溶液（μL）	-	-	100	-
定磷试剂（μL）	500	500	500	500
蒸馏水（μL）	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 ΔA=A 测定管-A 对照管，ΔA 标准=A 标准管-A 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，0.625μmol/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，1μmol=1000nmol。

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：
 $G6P \text{ (U/g 质量)} = 312.5 \times \Delta A \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 312.5 \times 0.044 \div 0.495 \div 0.1 = 277.7778 \text{ U/g 质量}$ 。
- 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：
 $G6P \text{ (U/g 质量)} = 312.5 \times \Delta A \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 312.5 \times 0.142 \div 0.495 \div 0.1 = 896.4646 \text{ U/g 质量}$ 。

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.

相关系列产品：

- BC0730/BC0735 丙酮酸羧化酶（PC）活性检测试剂盒
BC0920/BC0925 果糖-1,6-二磷酸（酯）酶（FBP）活性检测试剂盒