

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最后一步酶促反应, 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	使用前甩几下或离心使粉剂落入底试剂一粉剂 mg×1 瓶-20℃保存部, 临用前加 3.6mL 蒸馏水溶解
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: 粉体 mg×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; 试剂配置最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。

α -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 (10⁴ 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测。

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:

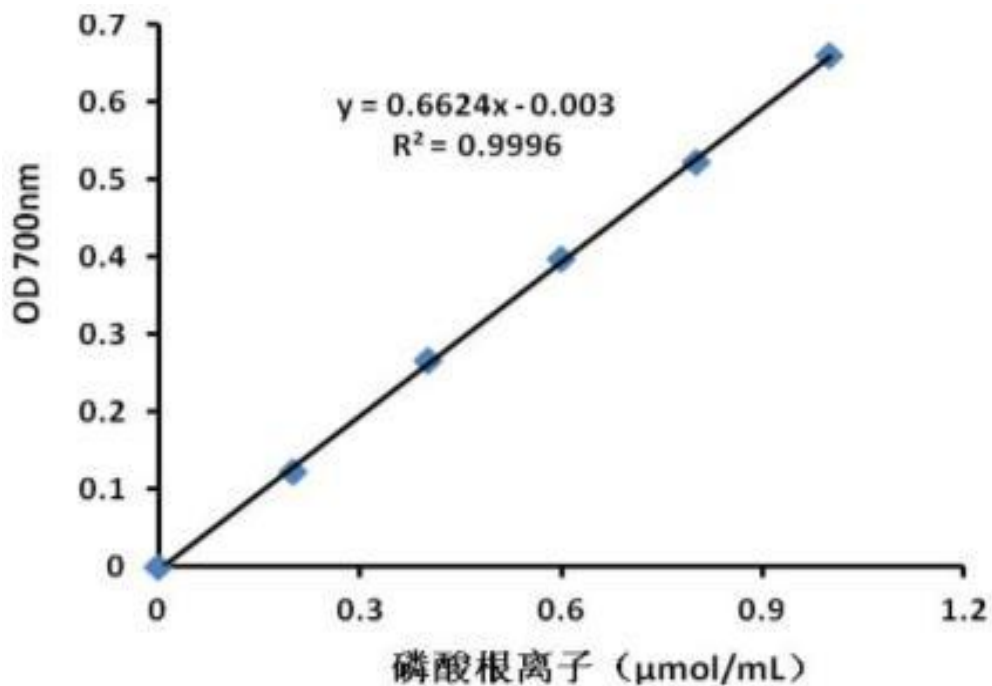
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	60	
提取液	60	60
试剂一	60	60
混匀，37℃ 孵育 30min。		
试剂二	60	60
样本		60
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，取上清待测。		

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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (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 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

定义：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。

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

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。

$$GPP(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.003) \div 0.6624 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 12.08 \times (\Delta A + 0.003) \div W。$$

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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

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 μ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

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

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 μ 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. μ 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。