

## 3-磷酸甘油酯酶（GPP）活性测定试剂盒说明书

（分光法 24 样）

### 一、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。

### 二、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-20℃分装保存。
试剂二	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 3mL×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。
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。

### 三、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。

### 四、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℃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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

[注]：也可按照细菌或细胞数量（10<sup>4</sup>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

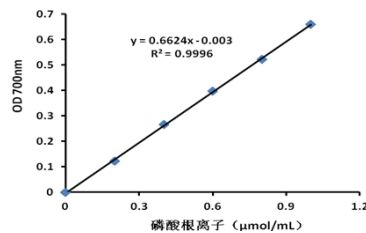
样本	60	
提取液	60	60
试剂一	60	60
混匀, 37°C 孵育 30min。		
试剂二	60	60
样本		60
混匀, 12000rpm, 4°C 离心 5min, 取上清待测。		

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, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

## 五、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 ( $\mu\text{mol/mL}$ ),  $y$  是  $\Delta A$ 。



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  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

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

3、按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织分解底物产生  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

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

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  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个酶活力单位。

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

5、按液体体积计算:

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

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

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 ( $5\mu\text{mol/mL}$ ): 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。