

3-磷酸甘油酯酶（GPP）活性测定试剂盒说明书

（微板法 48 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 60mL×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 6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂-20℃分装保存。
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 2mL×1 瓶	4℃保存	临用前在试剂 A 中加 1.8mL 的 B 液，再加 23.2mL 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：

酶标仪、EP 管、96 孔板、可调式移液器、台式离心机、水浴锅、研钵、冰和蒸馏水。

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（ 10^4 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测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 700nm。

② 在 EP 管中依次加入下列试剂：

试剂名称（ μ L）	测定管	对照管
----------------	-----	-----

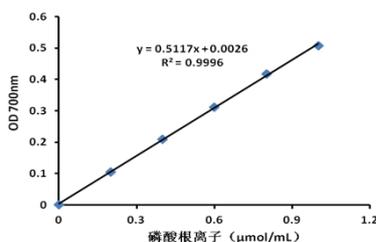
样本	50	
提取液	50	50
试剂一	50	50
混匀, 37°C 孵育 30min。		
试剂二	50	50
样本		50
混匀, 12000rpm, 4°C 离心 5min, 取上清待测。		

③ 显色反应, 在 96 孔板中加入:

上清液	50	50
试剂三	200	200
混匀, 室温静置 3min, 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: $y = 0.5117x + 0.0026$, x 是标准品摩尔质量 ($\mu\text{mol/mL}$), 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 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = \frac{[(\Delta A - 0.0026) \div 0.5117 \times V2]}{(V1 \times \text{Cpr})} \div T = 15.63 \times (\Delta A - 0.0026) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算:

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

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = \frac{[(\Delta A - 0.0026) \div 0.5117 \times V2]}{(W \times V1 \div V)} \div T = 15.63 \times (\Delta A - 0.0026) \div W$$

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。

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{ cell}) = \frac{[(\Delta A - 0.0026) \div 0.5117 \times V2]}{(500 \times V1 \div V)} \div T = 0.031 \times (\Delta A - 0.0026)$$

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。

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h/mL}) = \frac{[(\Delta A - 0.0026) \div 0.5117 \times V2]}{V1} \div T = 15.63 \times (\Delta A - 0.0026)$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.05mL ;

V2---酶促反应总体积, 0.2mL;

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梯度的标准品: 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。