

## 3-磷酸甘油酯酶（GPP）活性测定试剂盒说明书

（货号：ADS-F-T023 分光法 24 样 有效期：3 个月）

### 一、指标介绍：

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：

| 试剂组分 | 试剂规格                     | 存放温度      | 注意事项   |
|------|--------------------------|-----------|--|
| 提取液  | 液体 35mL×1 瓶              | 4℃ 保存     |  |
| 试剂一  | 粉剂 1 瓶                   | -20℃ 避光保存 | 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 3.6mL 蒸馏水溶解备用；<br>3. 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 1 瓶<br>B:液体 5mL×1 瓶 | 4℃ 避光保存   | 1. 临用前在试剂 A 中加 4.57mL 的 B 液，再加 35.43mL 的蒸馏水，混匀溶解备用；<br>2. 用不完的试剂 4℃ 保存，需避光，现配现用，变蓝色不能使用。 |
| 标准品  | 粉体 1 支                   | 4℃ 保存     | 1. 若重新做标曲，则用到该试剂；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>3. 溶解后的标品一周内用完。                             |

【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，避免磷污染。

### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本提取：

##### 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、检测步骤：

- 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：

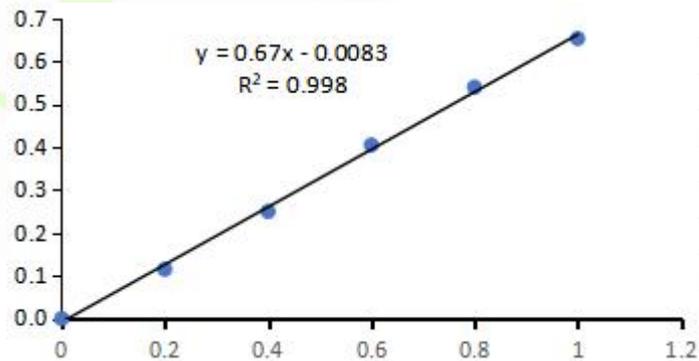
| 试剂组分 (μL)                      | 测定管 | 对照管 |
|--------------------------------|-----|-----|
| 样本                             | 60  |     |
| 提取液                            | 60  | 60  |
| 试剂一                            | 60  | 60  |
| 混匀，37°C 孵育 30min。              |     |     |
| 试剂二                            | 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<br>(光径 1cm)，700nm 下读取各管吸光值 A，<br>$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。 |     |     |

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.67x - 0.0083$ ，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。

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0083) \div 0.67 \times V_2] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T = 11.94 \times (\Delta A + 0.0083) \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0083) \div 0.67 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 11.94 \times (\Delta A + 0.0083) \div W$$

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。

$$\text{GPP}(\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0083) \div 0.67 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.024 \times (\Delta A + 0.0083)$$

5、按液体体积计算：

