6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGDH)试剂盒说明书

（货号：PB1030F48　分光法　48 样）

有效期：3 个月

测定意义：

磷酸戊糖途径途径中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）和 6PGDH 依次催化 NADPH 合成，与能量的平衡、生长速率和细胞活力等密切相关。此外，6PGDH 逆境生理中具有重要作用。

测定原理：

6PGDH 催化 6-磷酸葡萄糖酸和 $NADP^+$生成 NADPH，NADPH 在 430 nm 有特征吸收峰，而 $NADP^+$没有；通过测定 340nm 吸光度增加速率，计算 6PGDH 活性。

自备仪器和用品：

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、**1mL 石英比色皿**和蒸馏水。

试剂组成和配置：

试剂一：液体 100ml×1 瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃保存。临用前配制，加入 5 mL 试剂一，混匀。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃保存。临用前配制，加入 5 mL 试剂一，混匀。

粗酶液提取：

称约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一，冰上充分研磨，10000rpm 4℃离心 10min，取上清液，待测。

测定：

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂一置于 25℃或者 37℃水浴预热 30 min 以上。
3. 空白管：取 1mL 石英比色皿，依次加入 100μL 蒸馏水，100μL 试剂二，700μL 试剂一，100μL 试剂三，于 340nm 处测定 3min 内吸光值变化，第 0s 吸光值记为 A1，第 180s 吸光值记为 A2。
4. 测定管：取 1mL 石英比色皿，依次加入 100μL 粗酶液，100μL 试剂二，700μL 试剂一，100μL 试剂三，于 340nm 处测定 3min 内吸光值变化，第 10 s 吸光值记为 A3，第 190s 吸光值记为 A4。

6PGDH 活性计算：

活性单位定义：每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1U（U/mg pr）。

6PGDH 酶活性(U/mg prot)

$= [(\triangle A\text{ 测定管}-\triangle A\text{ 空白管})\times V\text{ 反总}\div\varepsilon\div d\times 10^9]\div(Cpr\times V\text{ 样})\div T$

$= 535.9\times(\triangle A\text{ 测定管}-\triangle A\text{ 空白管})\div Cpr$

△A 测定管：A4－A3；△A 空白管：A2－A1；ε：NADPH 摩尔消光系数，6220；d：比色皿光径，1 cm；　V 反总：反应体系总体积，0.001 L；Cpr：粗酶液蛋白质浓度，mg/mL，需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒；V 样：反应体系中加入粗酶液体积，0.1 mL；T：反应时间，3 min。

注意事项：

（1）样品处理等过程均需要在冰上进行，且须在提取当日完成酶活性测定，粗酶液避免反复冻融；

（2）试剂二和试剂三须现配现用，当天未用完试剂保存在 4℃，可保存 1 周。