



6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-PGDH) 试剂盒说明书

(货号: PB1030W96 微量法 96 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 340 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:

低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

试剂组成和配置:

试剂一: 液体 120ml×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4℃ 避光保存。临用前配制, 加入 2mL 试剂一, 混匀。

试剂三: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存。临用前配制, 加入 2mL 试剂一, 混匀。

粗酶液提取:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 1000~5000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

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:** 取微量石英比色皿/96 孔板, 依次加入 20μL 蒸馏水, 20μL 试剂二, 140μL 试剂一, 20μL 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:** 取微量石英比色皿/96 孔板, 依次加入 20μL 粗酶液, 20μL 试剂二, 140μL 试剂一, 20μL 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:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

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。

6PGDH 酶活性(U/mg prot)

$$\begin{aligned} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反应} \div (\varepsilon \times d) \times 10^6] \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 535.9 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div C_{pr} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算



活性单位定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1U。

6PGDH 酶活性(U/g 鲜重)

$$= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T$$
$$= 535.9 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W$$

(3) 按液体计算

活性单位定义：每毫升液体每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1U。

6PGDH 酶活性(U/ml)

$$= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div V \text{ 样} \div T$$
$$= 535.9 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白})$$

(4) 按细菌、细胞个数计算

活性单位定义：每 10⁴ 个细菌、细胞每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1U。

6PGDH 酶活性(U/10⁴ cell)

$$= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) \div T$$
$$= 535.9 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div 500$$

ΔA 测定管：A4—A3； ΔA 空白管：A2—A1； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：比色皿光径，1 cm；V 反总：反应体系总体积，0.0002 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，0.02mL；V 样总：提取液体积，1 mL；T：反应时间，3 min；500：细菌或细胞总数，500 万。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

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 prot)。

6PGDH 酶活性(U/mg prot)

$$= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T$$
$$= 1071.8 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算

活性单位定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1U (U/mg pr)。

6PGDH 酶活性(U/g 鲜重)

$$= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T$$
$$= 1071.8 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W$$

(3) 按液体计算

活性单位定义：每毫升液体每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1U。

6PGDH 酶活性(U/ml)

$$= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div V \text{ 样} \div T$$
$$= 1071.8 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白})$$

(4) 按细菌、细胞个数计算

活性单位定义：每 10⁴ 个细菌、细胞每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1U。

6PGDH 酶活性(U/10⁴ cell)

$$= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) \div T$$
$$= 1071.8 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div 500$$

ΔA 测定管：A4—A3； ΔA 空白管：A2—A1； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数，6220；d：96 孔板光径，



0.5 cm; V 反总: 反应体系总体积, 0.0002 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, 0.02mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 3 min; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

注意事项:

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