6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)试剂盒说明书

（货号：PB1031F48　分光法　48 样）

有效期：3 个月

测定意义：

G6PDH（EC 1.1.1.49）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，是磷酸戊糖途径的关键酶，催化 6-磷酸葡萄糖氧化为 6 -磷酸葡萄糖酸内酯，同时将 $NADP^+$还原为 NADPH，供生物合成及维持细胞内的还原状态用。因此 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性的高低可以从一定程度上反映出生物体的生物合成和抗氧化能力。

测定原理：

G6PDH 催化 $NADP^+$还原生成 NADPH，在 340 nm 下测定 NADPH 增加速率。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 50 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1，-20℃保存；用时每支加 275μL 双蒸水充分溶解备用；

试剂三：粉剂×1，-20℃保存；用时每只加 275μL 双蒸水充分溶解备用。

样本的前处理：

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，弃上清，按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，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：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。

G6PDH 测定操作表：

试剂名称（μL）	测定管
试剂一	750
试剂二	10
试剂三	10
样本	30

测定前将试剂一置于 37℃(哺乳动物)或 25℃（其它物种）水浴中预热 10min 左右，将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中，加样本的同时开始计时；混匀，在 34 0 nm 波长下记录 1min 时的初始吸光度 A1，迅速将比色皿连同反应液一起放入 37℃(哺乳动物)或 25℃（其它物种）水浴中，准确反应 5min；迅速取出比色皿并擦干，记录 6min 时的吸光度 A2，计算 ΔA=A2-A1。

注意事项：

1、若 A2-A1 大于 0.5，需将酶液用提取液稀释，使 A2-A1 小于 0.5，可提高检测灵敏度。

2、实验时，试剂二、试剂三和样本在冰上放置，以免变性和失活。试剂一 37℃或 25℃水浴放置。

3、比色皿中反应液的温度必须保持 37℃或 25℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃或 25℃蒸馏水，

将此烧杯放入 37℃或 25℃水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。

4、最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。

G6PDH 活力单位的计算：

1、血清（浆）G6PDH 活力的计算:

单位的定义：每升血清（浆）在反应体系中每分钟生成 1 μmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

G6PDH（U/L）＝反应总体积（800μL）÷样本体积（30μL）÷反应时间(5min)÷NADPH 消光系数（6.22×10^{-3}）×ΔA =857×ΔA

2、组织中 G6PDH 活力的计算:

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

G6PDH（U/mg prot）＝反应总体积（800μL）÷样本体积（30μL）÷反应时间(5min)÷NADPH 消光系数（6.22×10^{-3}）×ΔA ÷蛋白质浓度（mg/mL）=857×ΔA÷蛋白质浓度（mg/mL）

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

G6PDH（U/g 鲜重）＝反应总体积（800μL）÷样本体积（30μL）÷反应时间(5min)÷NADPH 消光系数（6.22×10^{-3}）×ΔA÷样品鲜重（g/mL）=857×ΔA÷样品鲜重（g/mL）

3、细菌或细胞中 G6PDH 活力的计算:

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

G6PDH（U/mg prot）＝反应总体积（800μL）÷样本体积（30μL）÷反应时间(5min)÷NADPH 消光系数（6.22×10^{-3}）×ΔA ÷蛋白质浓度（mg/mL）=857×ΔA÷蛋白质浓度（mg/mL）

（2）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

G6PDH（U/10^4 cell）＝反应总体积（800μL）÷样本体积（30μL）÷反应时间(5min)÷NADPH 消光系数（6.22×10^{-3}）×ΔA ÷500（10^4 个/mL）=1.714×ΔA（10^4 个/mL）