

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6-PGDH) 活性测定试说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

组成：

产品名称	AE016-100T/96S	Storage
提取液：液体	100ml	4°C
试剂一：液体	19ml	4°C
试剂二：粉剂	1 瓶	-20°C避光
试剂三：粉剂	1 瓶	-20°C
说明书	一份	

自备仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、酶标仪、96 孔板和蒸馏水。

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 (10^4 个)：提取液体积 (ml) 为 1000~5000: 1 的比例 (建议 2000 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°C 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°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、血清 (浆) 样品：直接检测。

测定步骤：

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司，保留一切权利



1. 酶标仪预热 30min, 调节波长到 340 nm。
 - 2 将试剂二和试剂三转移至试剂一中充分溶解; 在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 10min 以上; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。
 3. 取 96 孔板, 依次加入 10 μ l 样本 190 μ l 试剂一, 于 340nm 处测定 3min 内吸光值变化, 第 10 s 吸光值记为 A1, 第 190s 吸光值记为 A2。 $\Delta A=A2-A1$
- 注意: 空白管只需要做一次。

6-PGDH 酶活性计算:

使用 96 孔板测定的计算公式如下

1、血清(浆) 6PGDH 活力的计算:

单位的定义: 每 ml 血清(浆) 每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$6PGDH \text{ (nmol/min/ml)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 2143.6 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 6PGDH 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$6PGDH \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T = 2143.6 \times \Delta A \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$6PGDH \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2143.6 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$6PGDH \text{ (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.072 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 1 $\times 10^{-3}$ L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L / mol /cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.05 ml; V 样总: 加入提取液体积, 1 ml; T: 反应时间, 3 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/ml; W: 样本质量, g; 2000: 细菌或细胞总数, 2000 万。

注意事项:

1. 配制好的工作液 4°C 稳定 7 天, 请配制后尽快使用。
2. 血清的 CK 不稳定, 采集样本后尽快测定, 4°C 避光保存可稳定 24h。
3. 样品蛋白质含量需要另外测定, 可选用 BCA 蛋白含量测定试剂盒进行测定。
4. OD 值大于 0.5 可用提取液适当稀释样品, 并在计算公式中相应的改变稀释倍数。

