

6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）活性检测试剂盒

紫外分光光度法

注意：正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

货号: BC0260

规格: 50T/48S

产品内容:

提取液：液体50mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体50 mL×1瓶，4℃保存（切忌放-20℃）；

试剂二：粉剂×1支，4℃保存；用时每支加650μL双蒸水充分溶解备用；

试剂三：粉剂×1支，4℃保存；用时每支加650μL双蒸水充分溶解备用。

产品说明:

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。

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。

操作步骤:

一、样本的处理

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。

二、测定步骤

1、紫外分光光度计预热30min以上，调节波长到340 nm，蒸馏水调零。

2. 试剂一置37℃水浴预热30 min。

3. 工作液配制：临用前将试剂一、试剂二、试剂三以15：0.2：0.2比例混合。

4. 加样表:

试剂名称（μL）	测定管（μL）	空白管（μL）
工作液	950	950
样本	50	-
蒸馏水	-	50

于340nm处测定5min内吸光值变化，第0s吸光值记为A1，第300s吸光值记为A2。记ΔA测定=A2测定-A1测定，ΔA空白=A2空白-A1空白。

三、G6PDH活力单位的计算：

1、血清（浆）G6PDH活力的计算：

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

$$\text{G6PDH (U/mL)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样本}} \div T \\ = 643 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

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。

$$\text{G6PDH (U/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ = 643 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

（2）按样本鲜重计算：

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

$$\text{G6PDH (U/g 鲜重)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T \\ = 643 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

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。

$$\text{G6PDH (U/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ = 643 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

（2）按细菌或细胞数量计算：

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。

$$\text{G6PDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \div T \\ = 1286 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

ϵ ：NADPH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：1 mL石英比色皿光径，1cm； $V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，0.001L； $V_{\text{样本}}$ ：加入样本体积，0.05mL； T ：反应时间，5min； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液体积，1mL； C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL； W ：样本鲜重，g；500：细菌或细胞总数，500万； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

注意事项：

- 1、实验时，样本在冰上放置，以免变性和失活。试剂一37°C水浴放置。
- 2、比色皿中反应液的温度必须保持37°C，取小烧杯一只装入一定量的37°C蒸馏水，将此烧杯放入37°C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。
- 3、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。
- 4、若样本测定初始值（0s）大于0.5而 ΔA 测定小于0.1，可将样本稀释后再行测定。