

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0323

Size: 100T/96S

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6PGDH）检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义：

糖原磷酸化酶（Glycogen phosphorylase, GP, EC 2.4.1.1）是糖原分解代谢的关键酶，使糖原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。

二、测定原理：

6PGDH 催化 6-磷酸葡萄糖酸和 NADP^+ 生成 NADPH, NADPH 在 340nm 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。

三、需自备的仪器和用品：

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（ZC-1036: UV板）和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前配制，加入 2mL 试剂一，混匀
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前配制，加入 2mL 试剂一，混匀

五、粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL试剂一）进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴个）：试剂一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后 8000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清、培养液等液体：直接测定。

六、测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到340nm，蒸馏水调零。
2. 试剂一置于25℃或者37℃水浴预热30min。
3. 空白管：取微量石英比色皿/96孔板（UV板），依次加入20 μL蒸馏水，20 μL试剂二，140 μL试剂一，20 μL试剂三，于340nm处测定3min内吸光值变化，第10s吸光值记为A1，第190s吸光值记为A2。△A 空白管=A2-A1
4. 测定管：取微量石英比色皿/96孔板（UV板），依次加入20 μL粗酶液，20 μL试剂二，140 μL试剂一，20 μL试剂三，于340nm处测定3min内吸光值变化，第10s吸光值记为A3，第190s吸光值记为A4。△A测定管=A4-A3

注意：空白管只需要做一次。

七、计算公式：

- 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1个酶活单位。

$$6\text{PGDH酶活性 (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 535.9 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

（2）按样本质量计算

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

$$6\text{PGDH酶活性 (nmol/min/g)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 535.9 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：每 10^4 个细胞每分钟催化产生1nmol NADPH的酶量为1个酶活单位。

6PGDH 酶活性(nmol/min/ 10^4 cell) = $[(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div \epsilon \div d \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 535.9 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$

(4) 按液体体积计算

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

6PGDH 酶活性(nmol/min/mL) = $[(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div \epsilon \div d \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 535.9 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}})$

ϵ : NADPH摩尔消光系数, 6220L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.0002L; 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; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入粗酶液体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 3min。

● 使用96孔板(UV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1个酶活单位。

6PGDH酶活性(nmol/min/mg prot) = $[(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1071.8 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本质量计算

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

6PGDH酶活性(nmol/min/g) = $[(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 1071.8 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：每 10^4 个细胞每分钟催化产生1nmol NADPH的酶量为1个酶活单位。

6PGDH 酶活性(nmol/min/ 10^4 cell) = $[(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div \epsilon \div d \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1071.8 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$

(4) 按液体体积计算

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

$$\text{6PGDH 酶活性 (nmol/min/mL)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div \epsilon \div d \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T$$
$$= 1071.8 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}})$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6220L/mol/cm; d: 96 孔板 (UV板) 光径, 0.5cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.0002 L; C_{pr} : 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; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入粗酶液体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 3min。

八、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°C, 可保存 2 天.