

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-S0590

Size: 50T/48S

6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PDH) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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:

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。

二、测定原理:

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

三、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。

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
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 650 μL 双蒸水充分溶解备用
试剂三	粉剂×1 支	4℃保存	用时每支加 650 μL 双蒸水充分溶解备用。

五、操作步骤:

1. 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。

2. 测定步骤

1) 紫外分光光度计预热 30min 以上,调节波长到 340nm,蒸馏水调零。

2) 试剂一置 37℃水浴预热 30min。

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 $\Delta A_{\text{测定}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}$, $\Delta A_{\text{空白}} = A2_{\text{空白}} - A1_{\text{空白}}$ 。

六、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 1nmol 的NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{G6PDH (U/mL)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样本} \div T \\ &= 643 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \end{aligned}$$

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 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

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 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

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 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

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1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6PDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样本} \div V \text{ 提取} \times 500) \div T = 1.286 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白})$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 1mL 石英比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应总体积, 0.001L; V 样本: 加入样本体积, 0.05mL; T : 反应时间, 5min; V 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, $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

七、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。