

上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 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

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。

测定原理：

6PGDH催化6-磷酸葡萄糖酸和NADP<sup>+</sup>生成NADPH，NADPH在340nm有特征吸收峰，而NADP<sup>+</sup>没有；通过测定340nm吸光度增加速率，计算6PGDH活性。

自备仪器和用品：

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(UV板)和蒸馏水。

试剂组成和配制：

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

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（10<sup>4</sup>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。

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°C或者37°C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。ΔA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。ΔA测定管=A4-A3

注意: 空白管只需要做一次。

计算公式:

a. 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。

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

(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。

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

(3) 按细胞数量计算

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

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

(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。

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

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样: 反应体系中加入粗酶液体积, 0.02mL; V样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 3min。

b. 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。

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

(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。

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

(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  $1\text{nmol}$  NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

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

(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  $1\text{nmol}$  NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

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

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

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  $4^{\circ}\text{C}$ , 可保存 2 天。