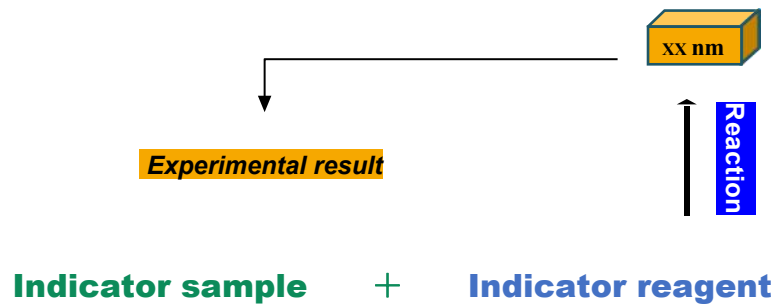


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

6-磷酸葡萄糖糖酸脱氢酶（6PGDH）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

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。

自备仪器和用品：

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、1mL 石英比色皿和蒸馏水。

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 5 mL 试剂一，混匀
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前配制，加入 5 mL 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（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。

测定操作：

1. 分光光度计预热 30min，调节波长到340 nm，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1mL石英比色皿，依次加入100 μL 蒸馏水，100 μL 试剂二，700 μL试剂一，100 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 1mL石英比色皿，依次加入100 μL 粗酶液，100 μL试剂二，700 μL试剂一，100 μL 试剂三，于 340nm 处测定 3min 内吸光值变化，第 10 s 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:

(1) 按照蛋白浓度计算

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。

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

(2) 按照样本质量计算

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。

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

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义: 每 10⁴ 个细胞每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

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

(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。

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

ε : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$; d : 比色皿光径, 1 cm; V 反总: 反应体系总体积, 0.001 L; 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, 0.1 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 3 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°C, 可保存 2 天。