

## 6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）试剂盒说明书

（货号：G0805F 分光法 48 样）

## 一、产品简介：

6-磷酸葡萄糖脱氢酶（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，同时维持 NADPH 在细胞内的水平，NADPH 反过来维持细胞中谷胱甘肽水平进而保护细胞免受氧化损伤。因此 G6PDH 活性的高低可以从一定程度上反映生物体的生物合成和抗氧化能力。

G6PDH 催化 6-磷酸葡萄糖氧化为 6-磷酸葡萄糖酸内酯，同时将  $\text{NADP}^+$  还原为 NADPH，传统方法是检测 NADPH 在 340nm 处的吸光值。由于 NADPH 的摩尔消光系数 ( $\epsilon$ ) 较低，所以这种方法灵敏度低，且严重受到干扰。

本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法：该酶促过程产生的 NADPH 与特异显色剂反应产生在 450nm 处有最大吸收峰的有色物质，通过检测 450nm 处的增加速率，进而计算出 G6PDH 酶活性大小。

## 二、试剂盒组成和配制：

| 试剂名称 | 规格           | 保存要求   | 备注                                        |
|------|--------------|--------|-------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶  | 4℃保存   |                                           |
| 试剂一  | 液体 50mL×1 瓶  | 4℃保存   |                                           |
| 试剂二  | 粉剂 mg×1 瓶    | 4℃保存   | 临用前甩几下使粉体落入底部，再加 38mL 试剂一充分溶解，用不完试剂 4℃保存。 |
| 试剂三  | 液体 1.1mL×2 支 | 4℃保存   |                                           |
| 标准品  | 粉剂 mg×1 支    | -20℃保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂。                            |

## 三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰。

## 四、6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

## 1、样本制备：

① 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例提取

② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；4℃约 12,000rpm 离心 10min，取上清作为待测样品。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ $10^4$ ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

## 2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，设置温度 37℃，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

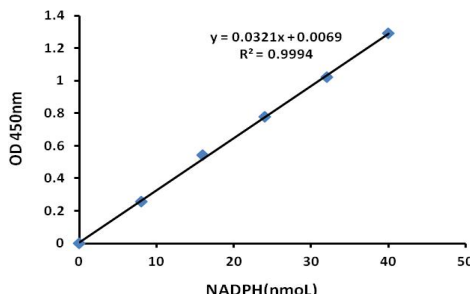
② 试剂放在 37℃水浴 5min；在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

| 试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）                                                              | 测定管 |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 样本                                                                                 | 40  |
| 试剂二                                                                                | 720 |
| 试剂三                                                                                | 40  |
| 混匀，立即于 450nm 处读取 A1 值，20min 后读取 A2 值，<br>（观察：酶活性越大，则黄色越明显）， $\Delta A = A2 - A1$ 。 |     |

【注】：若 $\Delta A$  过小，可以延长反应时间（如：60min 或更长）再读取  $A_2$ ，或加大样本取样量（如增加到 0.2g），重新调整的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0321x + 0.0069$ ，x 是 NADPH 摩尔质量：nmol,y 是 $\Delta A$ 。



2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：在 37°C，每毫克组织蛋白每分钟使 1 nmol 6-磷酸葡萄糖氧化成 1 nmol 6-磷酸葡萄糖酸内酯并且使 1 nmol  $NADP^+$  转换成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$G6PDH(nmol/min/mg \text{ prot}) = [(\Delta A - 0.0069) \div 0.0321] \div (V1 \times Cpr) \div T = 38.94 \times (\Delta A - 0.0069) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：在 37°C，每克组织每分钟使 1 nmol 6-磷酸葡萄糖氧化成 1 nmol 6-磷酸葡萄糖酸内酯并且使 1 nmol  $NADP^+$  转换成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$G6PDH(nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0069) \div 0.0321] \div (W \times V1 \div V) \div T = 38.94 \times (\Delta A - 0.0069) \div W$$

4、按细胞数量计算：

单位定义：在 37°C，每  $10^4$  个细胞每分钟使 1 nmol 6-磷酸葡萄糖氧化成 1 nmol 6-磷酸葡萄糖酸内酯并且使 1 nmol  $NADP^+$  转换成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$G6PDH(nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0069) \div 0.0321] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.078 \times (\Delta A - 0.0069)$$

5、液体样本中 G6PDH 活力计算：

单位的定义：在 37°C，每毫升液体每分钟使 1 nmol 6-磷酸葡萄糖氧化成 1 nmol 6-磷酸葡萄糖酸内酯并且使 1 nmol  $NADP^+$  转换成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$G6PDH(nmol/min/mL) = [(\Delta A - 0.0069) \div 0.0321] \div V1 \div T = 38.94 \times (\Delta A - 0.0069)$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.04 mL； W---样本质量，g。

T---反应时间，20 min；若加大了反应时间，则重新调整的反应时间值要代入公式重新计算；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1nmol/ $\mu$ L）：向标准品 EP 管里面加入 0.6mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20°C保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/ $\mu$ L。
- 3 依据 40 $\mu$ L 标准品+720 $\mu$ L 试剂一+40 $\mu$ L 试剂三，混匀后室温 5min 后于 450nm 处读值，根据结果即可制作标准曲线。