

6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）试剂盒说明书

微量法 100管/96样

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：

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。

测定原理：

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

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体19 mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1瓶，-20℃保存；

试剂三：粉剂×1瓶，-20℃保存；

样本的前处理：

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，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为1000~5000：1的比例（建议2000万细菌或细胞加入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）；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约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。

G6PDH测定操作表：

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 将试剂二和试剂三转移至试剂一中充分溶解；在37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴10min以上；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
3. 在微量石英比色皿或96孔板中加入10μL样本和190μL试剂一，混匀后立即记录340nm处1min后吸光值A1和 6min后的吸光值A2，计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

注意事项：若 ΔA 大于0.5，需将酶液用提取液稀释，计算公式中乘以相应稀释倍数。或将反应时间缩短至2min，使 A_2-A_1 小于0.5，可提高检测灵敏度。

G6PDH活力单位的计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、血清（浆）G6PDH活力的计算:

单位的定义：每mL血清（浆）每分钟生成1 nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6PDH (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 643 \times \Delta A$$

2、组织、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组织蛋白每分钟生成1 nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6PDH (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 643 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义：每g组织每分钟生成1 nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6PDH (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义：每1万个细菌或细胞每分钟生成1 nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6PDH (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.3215 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.01 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；2000：细菌或细胞总数，2000万。

b.用96孔板测定的计算公式如下

1、血清（浆）G6PDH活力的计算:

单位的定义：每mL血清（浆）每分钟生成1 nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6PDH (nmol/min /mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 1286 \times \Delta A$$

2、组织、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组织蛋白每分钟生成1 nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6PDH (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义：每g组织每分钟生成1 nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6PDH (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义：每1万个细菌或细胞每分钟生成1 nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6PDH (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.01 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；2000：细菌或细胞总数，2000万。

