

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 (10^4 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 10 μ L 样本和 190 μ L 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。

$$\text{G6PDH (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 643 \times \Delta A$$

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。

$$\text{G6PDH (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 643 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{G6PDH (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{G6PDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.3215 \times \Delta A$$

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。

$$\text{G6PDH (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 1286 \times \Delta A$$

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。

$$\text{G6PDH (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{G6PDH (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{G6PDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

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。