



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGDH)活性检测试剂盒 (微量法)

货号: R41833

规格: 100T/96S

保质期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
试剂-A	60ml×2瓶	2-8℃保存
试剂-B	粉剂×1瓶	2-8℃保存
试剂-C	粉剂×1瓶	2-8℃保存

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

意义: 磷酸戊糖途径中 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。

原理: 6PGDH 催化 6-磷酸葡萄糖酸和 NADP⁺生成 NADPH, NADPH 在 340 nm 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。

自备用品:

低温离心机、紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液枪、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

试剂预配制:

试剂-B: 临用前加入 2mL 试剂-A 充分溶解备用

试剂-C: 临用前加入 2mL 试剂-A 充分溶解备用



粗酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g): 试剂-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂-A) 进行冰浴匀浆。8000g, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

2. 细胞: 按照细胞数量 (10⁴个): 试剂-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500万细胞加入 1mL 试剂-A), 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。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。

2. 试剂-A 置于 37℃水浴中保温 30min。

3. 按顺序加入下列试剂:

试剂名称	空白管(ul)	测定管(ul)
粗酶液		20
蒸馏水	20	
试剂-B	20	20
试剂-A	140	140
试剂-C	20	20

分别迅速混匀后于340nm处测定3min内吸光值变化, 第10s吸光值记为A空1,第190s吸光值记为A空2,△A空白管=A空2-A空1;于340nm处测定3min内吸光值变化, 第10 s吸光值记为A测3,第190s吸光值记为A测4,△A测定管=A测4-A测3。

注: 空白管只需要做 1-2 次

6PGDH 酶活性计算公式:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按样本蛋白浓度计算

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。

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

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。

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

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 1nmol NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

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

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。

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

注: ϵ : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1 cm;
 $V \text{ 反总}$: 反应体系总体积, 0.0002 L; C_{pr} : 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; $V \text{ 样}$: 反应体系中加入粗酶液体积, 0.02 mL; $V \text{ 样总}$: 加入提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 3 min。

b. 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。

$$6\text{PGDH (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) \div T = 1071.8 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div C_{pr}$$

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。



$$6\text{PGDH (U/g)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 1071.8 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W$$

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 1nmol NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$6\text{PGDH (U/}10^4\text{cell)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div \epsilon \div d \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1071.8 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

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 1nmol NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$6\text{PGDH (U/mL)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div \epsilon \div d \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 1071.8 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

注: ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6220L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5 cm; V 反总: 反应体系总体积, 0.0002 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, 0.02mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; 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-B 和 试剂-C 须现配现用, 当天未用完试剂保存在 4°C, 可保存 2 天。