

6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）试剂盒说明书

（货号：BP10219W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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。

G6PDH 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，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 (ϵ) 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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 19mL 试剂一充分溶解，用不完的试剂 4℃保存。
试剂三	液体 1.1mL×EP 管	4℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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（10⁴）：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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，设置温度 37℃，调节波长至 450nm。

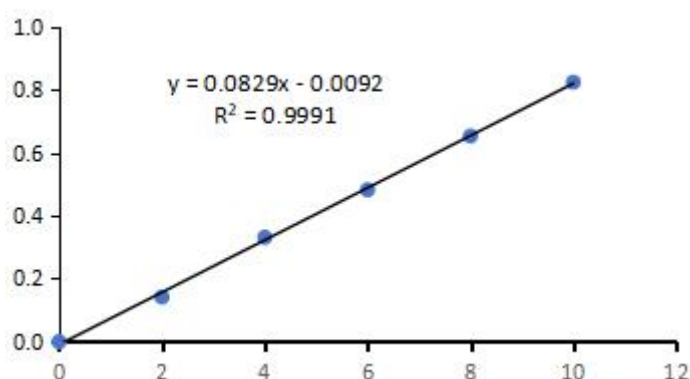
② 试剂放在 37℃水浴 5-15min；在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	10
试剂二	180
试剂三	10
混匀, 立即于 450nm 处读取 A1 值, 于 37°C 条件下, 20min 后读取 A2 值, (观察: 酶活性越大, 则黄色越明显) $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】: 若 ΔA 过小, 可以延长反应时间 (如: 60min 或更长) 再读取 A2, 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: $y = 0.0829x - 0.0092$, x 是 NADPH 摩尔质量: nmol, y 是 ΔA 。



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。

$$G6PDH(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0092) \div 0.0829] \div (V1 \times Cpr) \div T = 60.314 \times (\Delta A + 0.0092) \div Cpr$$

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。

$$G6PDH(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0092) \div 0.0829] \div (W \times V1 \div V) \div T = 60.314 \times (\Delta A + 0.0092) \div W$$

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。

$$G6PDH(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0092) \div 0.0829] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.1206 \times (\Delta A + 0.0092)$$

5、液体样本中 G6PDH 活力计算:

单位定义: 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。

$$G6PDH(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0092) \div 0.0829] \div V1 \div T = 60.314 \times (\Delta A + 0.0092)$$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1---加入样本体积, 0.01 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 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), 标准品母液浓度为 1nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/μL。

也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 nmol/ μ L	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	10	
蒸馏水		10
试剂一	180	180
试剂三	10	10
混匀，室温静置 5min 后于 450nm 处读值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		