

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6-PGDH）试剂盒说明书

（货号：BP10220W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6-PGDH, EC 1.1.1.43）是磷酸戊糖途径中关键酶之一，在维持细胞 NADPH 水平上起重要作用，与生物体能量平衡、生长速率和细胞活力等密切相关。

本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法：6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶催化 6-磷酸葡萄糖酸和 NADP⁺生成 NADPH。进而与特异显色探针反应生成有色物质，通过检测该有色物质的增加速率，计算出 6-PGDH 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

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. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩，量少，勿损失）； 2. 加入 17.5mL 试剂一充分溶解，用不完的试剂 4℃ 保存；
试剂三	液体 1.5mL×1 支	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 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 25℃，调节波长至 450nm。

② 试剂解冻至室温（25℃）；

③ 在 96 孔板中依次加入：

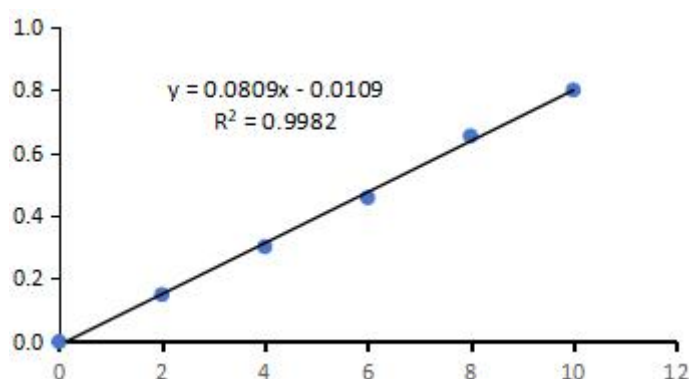
试剂组分（μL）	测定管
样本	20
试剂二	170
试剂三	10

混匀，25℃条件下，立即于 450nm 处读取 A1 值，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： $y = 0.0809x - 0.0109$ ，x 是 NADPH 摩尔质量（nmol），y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算

酶活定义：每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} 6PGDH(\text{nmol/min/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0109) \div 0.0809] \div (C_{pr} \times V1) \div T \\ &= 30.9 \times (\Delta A + 0.0109) \div C_{pr} \end{aligned}$$

3、按样本质量计算

酶活定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} 6PGDH \text{ 酶活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0109) \div 0.0809] \div (V1 \div V \times W) \div T \\ &= 30.9 \times (\Delta A + 0.0109) \div W \end{aligned}$$

4、按液体体积计算

酶活定义：每毫升液体每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} 6PGDH \text{ 酶活性}(\text{nmol/min/mL}) &= [(\Delta A + 0.0109) \div 0.0809] \div V1 \div T \\ &= 30.9 \times (\Delta A + 0.0109) \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02 mL；

W---样本质量，g。

T---反应时间，20 min；

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℃ 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, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. 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：

吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 0.5nmol/μL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 nmol/μL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5

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 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水		20
试剂一	170	170
试剂三	10	10
混匀，于 450nm 处读取 A 值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		