6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性检测试剂盒

G6PDH Assay Kit

紫外分光光度法

产品编号：AK381U

产品规格：50T/48S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES381	60mL×1 瓶	4℃保存；
AK381-A	47.5 mL×1 瓶	4℃保存；
AK381-B	粉剂×1 支	-20℃保存；
AK381-C	粉剂×1 支	-20℃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：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，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。

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

自备用品：

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取：

1. 细菌、细胞或组织样品的制备：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）：ES381 体积（mL）为 1000~5000：1 的比例（建议 2000 万细菌或细胞加入 1mL ES381），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。
2. 组织：按照组织质量（g）：ES381 体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL ES381），进行冰浴匀浆，8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
3. 血清（浆）等液体样品：直接测定。

测定步骤：

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
2. 工作液：将 AK381-B 和 AK381-C 转移至 AK381-A 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. 样本测定（按下表在 1mL 石英比色皿中加入如下试剂）

试剂名称	测定管（μL）	空白管（μL）
样本	50	
蒸馏水		50
工作液	950	950
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 ΔA 测定=A2 测定-A1 测定，ΔA 空白=A2 空白-A1 空白，ΔA=A 测定-A 空白。		
注意：若 ΔA 大于 0.5，需将酶液用 ES381 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 ΔA 小于 0.5，可提高检测灵敏度。		

G6PDH 活力单位的计算：

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。

   G6PDH (U/mL) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷V 样÷T = 643×ΔA

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。

   G6PDH (U/mg prot) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T = 643×ΔA÷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。

   G6PDH (U/g 鲜重) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(W× V 样÷V 样总) ÷T = 643×ΔA÷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。

   G6PDH (U/10^4 cell) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(2000×V 样÷V 样总) ÷T = 0.322×ΔA

   注：V 反总：反应体系总体积，1×10^{-3} 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，0.05 mL；V 样总：加入 ES381 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；10^9：单位换算系数，1mol =10^9nmol。

注：

1. 实验时，样本在冰上放置，以免变性和失活。
2. 比色皿中反应液的温度必须保持 37℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃蒸馏水，将此烧杯放入 37℃水浴锅中，在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
3. 最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。
4. 若样本测定初始值（0s）大于 0.5 而 ΔA 测定小于 0.1，可将样本稀释后再行测定。
5. 为保证每个样本的反应时间尽量一致不推荐同时测过多样本。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)