

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6-PGDH）活性测定试说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义

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。

测定原理

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。

自备实验用品及仪器

低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、酶标仪、96孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存。

试剂一：液体19mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：粉剂×1瓶，-20°C避光保存。

试剂三：粉剂×1瓶，-20°C保存。

粗酶液提取：

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（10⁴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°C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°C离心10min，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）样品：直接检测。

测定操作：

1. 酶标仪预热30min，调节波长到340 nm。

2. 将试剂二和试剂三转移至试剂一中充分溶解；在37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）水浴10min以上；用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融。

3. 取96孔板，依次加入10μL样本190μL试剂一，于340nm处测定3min内吸光值变化，第10 s吸光值记为A1，第190s吸光值记为A2。ΔA=A2-A1

注意：空白管只需要做一次。

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6-PGDH）活性测定试说明书 计算公式：

使用96孔板测定的计算公式如下

1、血清（浆）6PGDH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。

$$6\text{PGDH (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 2143.6 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中6PGDH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。

$$6\text{PGDH (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 2143.6 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$6\text{PGDH (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2143.6 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$6\text{PGDH (nmol/min /}10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.072 \times \Delta A$$

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：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.05 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，3 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。