

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6-PGDH）检测试剂盒（微量法）

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。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 19mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 避光保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃ 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（ 10^4 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℃ 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℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤:

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 10 μ L 样本 190 μ L 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。 $\Delta A=A2-A1$

注意: 空白管只需要做一次。

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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 1 $\times 10^{-3}$ L;

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ 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。