

## 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6-PGDH）检测试剂盒（分光光度法）

**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  $\text{NADP}^+$  生成 NADPH，NADPH 在 340 nm 有特征吸收峰，而  $\text{NADP}^+$  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 60mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 47.5mL×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. 分光光度计预热 30min，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。
2. 将试剂二和试剂三转移至试剂一中充分溶解；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. 取 1mL 石英比色皿，依次加入 50 $\mu$ L 样本和 950 $\mu$ 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。△A=A2-A1

**注意：空白管只需要做一次。**

## 计算公式：

### 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。

$$\begin{aligned} 6PGDH \text{ (nmol/min/mL)} &= [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T \\ &= 1071.8 \times \Delta A \end{aligned}$$

### 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。

$$\begin{aligned} 6PGDH \text{ (nmol/min /mg prot)} &= [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T \\ &= 1071.8 \times \Delta A \div Cpr \end{aligned}$$

#### (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。

$$\begin{aligned} 6PGDH \text{ (nmol/min /g 鲜重)} &= [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 1071.8 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

#### (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。

$$\begin{aligned} 6PGDH \text{ (nmol/min /} 10^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 0.536 \times \Delta A \end{aligned}$$

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：比色皿光径，1cm；

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。