

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6PGDH）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: AC10384

规格: 100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 60 mL×2 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前配制，加入 2.2 mL 试剂一，混匀；
- 2、试剂三：临用前配制，加入 2 mL 试剂一，混匀。

产品说明：

磷酸戊糖途径途径中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（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。

6PGDH 催化 6-磷酸葡萄糖酸和 NADP⁺生成 NADPH，NADPH 在 340nm 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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

称约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一，冰上充分研磨，10000rpm 4°C离心 10min，取上清粗酶液，待测。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 340nm，蒸馏水调零。
2. 试剂一置于 37°C水浴预热 30min 以上。
3. 加样表（在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中依次加入）

试剂名称（ μL ）	测定管（ μL ）	空白管（ μL ）
样本	20	-
蒸馏水	-	20
试剂一	140	140
试剂二	20	20
试剂三	20	20

于 340nm 处测定 3min 内吸光值变化, 第 0s 吸光值记为 A1, 第 180s 吸光值记为 A2。记 ΔA 测定=A2 测定-A1 测定, ΔA 空白=A2 空白-A1 空白。

三、6PGDH 活性计算

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

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

$$\begin{aligned} 6PGDH \text{ 酶活性(U/mg prot)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 536 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\begin{aligned} 6PGDH \text{ 酶活性(U/g 质量)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ &= 536 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W \end{aligned}$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 0.0002L; Cpr : 粗酶液蛋白质浓度, mg/mL, 需要另外测定; V 样: 反应体系中加入粗酶液体积, 0.02mL; V 样总: 提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 3min; W : 样本质量, g。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

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

$$\begin{aligned} 6PGDH \text{ 酶活性(U/mg prot)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 893 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\begin{aligned} 6PGDH \text{ 酶活性(U/g 质量)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ &= 893 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W \end{aligned}$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 96 孔板光径, 0.6cm; V 反总: 反应体系总体积, 0.0002L; Cpr : 粗酶液蛋白质浓度, mg/mL, 需要另外测定; V 样: 反应体系中加入粗酶液体积, 0.02mL; V 样总: 提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 3min; W : 样本质量, g。

注意事项:

1. 试剂二和试剂三须现配现用, 当天未用完试剂保存在 4°C , 可保存 1 周。
2. 样本处理等过程均需要在冰上进行, 且须在提取当日完成酶活性测定, 粗酶液避免反复冻融;
3. 若样本初始 (0s) 读值大于 0.5 且 ΔA 测定小于 0.1, 可尝试将样本进行稀释后测定。
4. 使用 96 孔板测定时, 可根据样本数量将试剂一 (预热后)、二、三预混为工作液, 因是根据反应速率计算酶活, 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。

实验实例:

1. 称约 0.1g 肾脏组织, 加入 1mL 试剂一, 冰上充分研磨, 10000rpm 4°C 离心 10min, 取上清稀释 5 倍, 用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定=A2 测定-A1 测定=0.4866-0.3035=0.1831, ΔA 空白=A2 空白-A1 空白=0.0325-0.0269=0.0056, 按样本质量计算酶活得:

6PGDH 酶活性(U/g 质量) = $536 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \times 5$ (稀释倍数) = 4757 U/g 质量。

相关发表文献：

[1] Wu S, Wang H, Li Y, et al. Transcription factor YY1 promotes cell proliferation by directly activating the pentose phosphate pathway[J]. Cancer research, 2018, 78(16): 4549-4562.