

6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号:AC10118

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 |
|------|---------------|-----------------|
| 提取液 | 液体 100 mL×1 瓶 | 4°C保存 |
| 试剂一 | 液体 20 mL×1 瓶 | 4°C保存（切忌放-20°C） |
| 试剂二 | 粉剂×1 支 | 4°C保存 |
| 试剂三 | 粉剂×1 支 | 4°C保存 |

溶液的配制：

- 1、试剂二：用时每支加 250 μ L 双蒸水充分溶解备用；
- 2、试剂三：用时每支加 250 μ L 双蒸水充分溶解备用。
- 3、工作液配制：临用前将试剂一、试剂二、试剂三以 15：0.2：0.2 比例混合。

产品说明：

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。

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

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：

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板（UV 板）、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

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）

1、细菌、细胞或组织样本的制备：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，弃上清，按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，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：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）样本：直接检测。

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：

| 试剂名称 (μL) | 测定管 (μL) | 空白管 (μL) |
|-----------|----------|----------|
| 工作液 | 190 | 190 |
| 样本 | 10 | - |
| 蒸馏水 | - | 10 |

于 340nm 处测定 5min 内吸光值变化, 第 0s 吸光值记为 A1, 第 300s 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、G6PDH 活力单位的计算

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、血清 (浆) G6PDH 活力的计算:

单位的定义: 每毫升血清 (浆) 在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$G6PDH (U/mL) = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样本} \div T = 643 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白})$$

2、组织中 G6PDH 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$G6PDH (U/mg \text{ prot}) = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样本} \times Cpr) \div T \\ = 643 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr$$

(2) 按样本质量计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$G6PDH (U/g \text{ 质量}) = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反总}] \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样本}) \div T \\ = 643 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W$$

3、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 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$G6PDH (U/mg \text{ prot}) = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样本} \times Cpr) \div T \\ = 643 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr$$

(2) 按细菌或细胞数量计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$G6PDH (U/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样本} \times 500 \div V \text{ 提取}) \div T \\ = 1.286 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白})$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 1mL 石英比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$; V 样本: 加入样本体积, 0.01mL; T : 反应时间, 5min; V 提取: 加入提取液体积, 1mL; Cpr : 样本蛋白浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1、血清 (浆) G6PDH 活力的计算:

单位的定义: 每毫升血清 (浆) 每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$G6PDH (U/mL) = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 1072 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白})$$

2、组织中 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 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{G6PDH (U/mg prot)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 1072 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{G6PDH (U/g 质量)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 提取} \times W) \div T \\ &= 1072 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W \end{aligned}$$

3、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 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{G6PDH (U/mg prot)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样本} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 1072 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{G6PDH (U/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样本} \times 500 \div V \text{ 提取}) \div T \\ &= 2.144 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \end{aligned}$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 96 孔板光径, 0.6 cm ; V 反总: 反应总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$; V 样本: 加入样本体积, 0.01 mL ; T : 反应时间, 5 min ; V 提取: 加入提取液体积, 1 mL ; Cpr : 样本蛋白浓度, mg/mL ; W : 样本质量, g ; 500 : 细菌或细胞数量, 500 万; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

注意事项：

- 1、实验时，样本在冰上放置，以免变性和失活。试剂一 37°C 水浴放置。
- 2、比色皿中反应液的温度必须保持 37°C ，取小烧杯一只装入一定量的 37°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°C 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、使用 96 孔板测定时，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、称取约 0.1 g 脾，加入 1 mL 提取液进行冰浴匀浆。 8000 g 4°C 离心 10 min ，取上清，之后按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管 = $A2$ 测定 - $A1$ 测定 = $1.2906 - 0.4521 = 0.8385$ ， ΔA 空白管 = $A2$ 空白 - $A1$ 空白 = $0.0276 - 0.026 = 0.0016$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{G6PDH (U/g 质量)} = 643 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W = 643 \times 0.8369 \div 0.1 = 5381.267 \text{ U/g 质量}。$$

2、取兔血清按照测定步骤操作直接测量，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A2 测定-A1 测定= 0.1528-0.136=0.0168， ΔA 空白管= A2 空白-A1 空白= 0.0276-0.026=0.0016，按液体体积计算酶活得：
G6PDH (U/mL) =643× (ΔA 测定- ΔA 空白) =643×0.0152=9.7736 U/mL。

相关发表文献：

[1] Yang Y, Liu W, Li D, et al. Altered glycometabolism in zebrafish exposed to thifluzamide[J]. Chemosphere, 2017, 183: 89-96.

[2] 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.

[3] Fan X, Hou T, Jia J, et al. Discrepant dose responses of bisphenol A on oxidative stress and DNA methylation in grass carp ovary cells[J]. Chemosphere, 2020, 248: 126110.

参考文献：

[1] Anderson B M, Wise D J, Anderson C D. Azotobacter vinelandii glucose 6-phosphate dehydrogenase properties of NAD-and NADP-linked reactions[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1997, 1340(2): 268-276.