

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6-PGDH）试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6-PGDH，EC 1.1.1.43）是磷酸戊糖途径中关键酶之一，在维持细胞 NADPH 水平上起重要作用，与生物体能量平衡、生长速率和细胞活力等密切相关。

本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法：6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶催化 6-磷酸葡萄糖酸和 NADP⁺生成 NADPH。进而与特异显色探针反应生成有色物质，通过检测该有色物质的增加速率，计算出 6-PGDH 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	用前甩几下使粉剂落入底部（量少，勿损失），再加 17.5mL 试剂一充分溶解，用不完的试剂 4℃ 保存；
试剂三	液体 1mL×EP 管	4℃ 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、和蒸馏水。

四、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6-PGDH）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃ 离心 15min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例提取

② 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，设置温度 25℃，调节波长至 450nm。

② 试剂解冻至室温（25℃）；

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管
样本	20
试剂二	170
试剂三	10

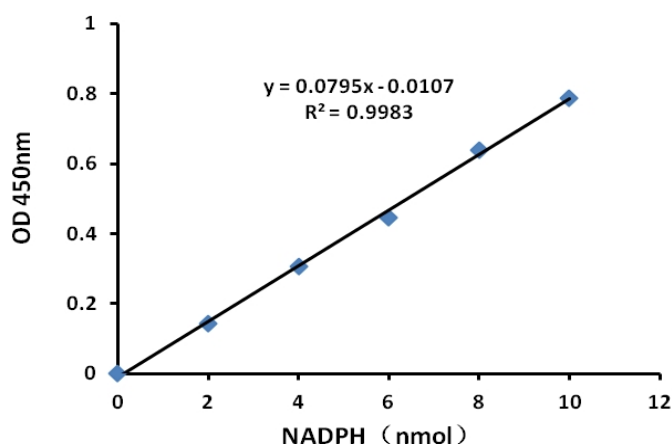
混匀，25℃ 条件下，立即于 450nm 处读取 A1 值，20min 后读取 A2 值，（观察：酶活性越大，则黄色越明显）。

$\Delta A = A2 - A1$ 。

【注】：若 ΔA 过小，可以延长反应时间（如：60min 或更长）再读取 A2，或加大样本取样量（如增加到 0.2g），重新调整的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0795x - 0.0107$ ， x 是 NADPH 摩尔质量 (nmol) , y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算

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

$$\begin{aligned} 6\text{PGDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0107) \div 0.0795] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 31.45 \times (\Delta A + 0.0107) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本质量计算

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

$$\begin{aligned} 6\text{PGDH 酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0107) \div 0.0795] \div (V1 \div V \times W) \div T \\ &= 31.45 \times (\Delta A + 0.0107) \div W \end{aligned}$$

4、按液体体积计算

酶活定义：每毫升液体每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} 6\text{PGDH 酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0107) \div 0.0795] \div V1 \div T \\ &= 31.45 \times (\Delta A + 0.0107) \end{aligned}$$

V----加入提取液体积，1 mL；

V1----加入样本体积，0.02 mL；

W----样本质量，g。

T----反应时间，20 min；

Cpr----样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (1nmol/ μ L)：向标准品 EP 管里面加入 0.6mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. nmol/ μ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照 20 μ L 标准品+170 μ L 试剂一+10 μ L 试剂三，根据结果即可制作标准曲线。