

6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

6-磷酸葡萄糖脱氢酶（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，同时维持 NADPH 在细胞内的水平，NADPH 反过来维持细胞中谷胱甘肽水平进而保护细胞免受氧化损伤。因此 G6PDH 活性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 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，传统方法是检测 NADPH 在 340nm 处的吸光值。由于 NADPH 的摩尔消光系数（ ϵ ）较低，所以这种方法灵敏度低，且严重受到干扰。

本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法：该酶促过程产生的 NADPH 与特异显色剂反应产生在 450nm 处有最大吸收峰的可有色物质，通过检测 450nm 处的增加速率，进而计算出 G6PDH 酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加入 19mL 试剂一充分溶解，用不完的试剂 4°C保存。
试剂三	液体 1.1ml×EP 管	4°C保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	-20°C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、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰。

四、6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）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°C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 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 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）；4°C 约 12,000rpm 离心 10min，取上清作为待测样品。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 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 37°C，调节波长至 450nm。

② 试剂放在 37°C水浴 5-15min；在 96 孔板中依次加入：

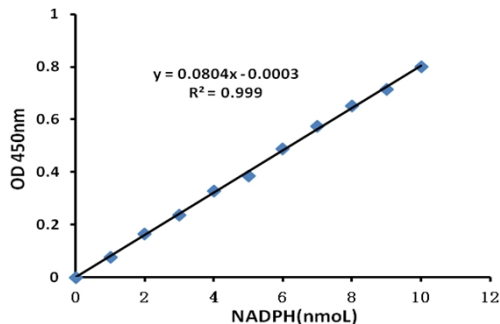
试剂名称（ μ L）	测定管
样本	10
试剂二	180
试剂三	10
混匀，立即于 450nm 处读取 A1 值，于 37°C条件下，20min 后读取 A2 值，（观察：酶活性越大，则黄色越明显） $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【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: $y=0.0804x-0.0003$, x 是 NADPH 摩尔质量: nmol,y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 在 37°C, 每毫克组织蛋白每分钟使 1 nmol 6-磷酸葡萄糖氧化成 1 nmol 6-磷酸葡萄糖酸内酯并且使 1 nmol $NADP^+$ 转换成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$G6PDH(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[(\Delta A+0.0003)\div 0.0804]\div (V1\times Cpr)\div T=62.189\times(\Delta A+0.0003)\div W$$

3、按样本鲜重计算:

单位定义: 在 37°C, 每克组织每分钟使 1 nmol 6-磷酸葡萄糖氧化成 1 nmol 6-磷酸葡萄糖酸内酯并且使 1 nmol $NADP^+$ 转换成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$G6PDH(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[(\Delta A+0.0003)\div 0.0804]\div (W\times V1\div V)\div T=62.189\times(\Delta A+0.0003)\div W$$

4、按细胞数量计算:

单位定义: 在 37°C, 每 10^4 个细胞每分钟使 1 nmol 6-磷酸葡萄糖氧化成 1 nmol 6-磷酸葡萄糖酸内酯并且使 1 nmol $NADP^+$ 转换成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$G6PDH(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0003)\div 0.0804]\div (500\times V1\div V)\div T=0.1244\times(\Delta A+0.0003)$$

5、液体样本中 G6PDH 活力计算:

单位定义: 在 37°C, 每毫升液体每分钟使 1 nmol 6-磷酸葡萄糖氧化成 1 nmol 6-磷酸葡萄糖酸内酯并且使 1 nmol $NADP^+$ 转换成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$G6PDH(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[(\Delta A+0.0003)\div 0.0804]\div V1\div T=62.189\times(\Delta A+0.0003)$$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1---加入样本体积, 0.01 mL; W---样本质量, g。

T---反应时间, 20 min; 若加大了反应时间, 则重新调整的反应时间值要代入公式重新计算;

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/ μL): 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°C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/ μL 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 10 μL 标准品+180 μL 试剂一+10 μL 试剂三, 混匀后室温 5min 后于 450nm 处读值, 根据结果即可制作标准曲线。