6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）试剂盒说明书

（货号：G0805F 分光法 48 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的水平进而保护细胞免受氧化损伤。因此 G6PDH 活性的高低可以从一定程度上反映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 与特异的显色剂反应，产生在 450nm 处有最大吸收峰的有色物质，通过检测该有色物质在 450nm 的增加速率，进而计算出 G6PDH 酶活性的大小。

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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	临用前加入 38mL 试剂一充分溶解，用不完的试剂 4℃保存;
试剂三	液体 2.1ml×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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、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℃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（10^4）：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 可见分光光度计预热 30min 以上，设置温度 37℃, 调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

② 试剂放在 37℃水浴 5min；

③ 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

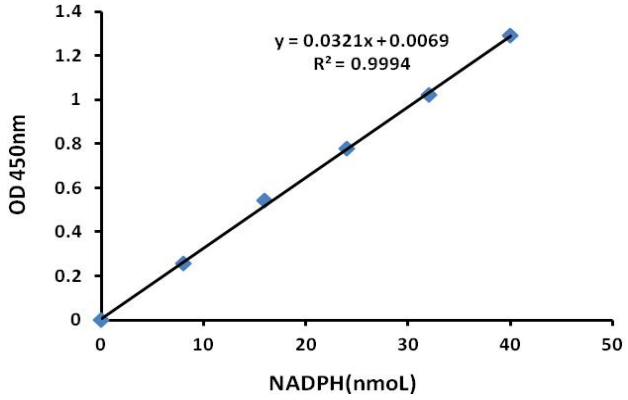
试剂名称（μL）	测定管
样本	40
试剂二	720

试剂三	40
混匀，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），ΔA=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 = 0.0321x + 0.0069，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℃，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（nmol/min /mg prot）＝[(ΔA-0.0069) ÷0.0321]÷ (V1×Cpr) ÷T=38.94×(ΔA-0.0069)÷Cpr

3、按样本鲜重计算：

单位定义：在 37℃，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（nmol /min /g 鲜重）＝[(ΔA-0.0069) ÷0.0321]÷(W× V1÷V) ÷T=38.94×(ΔA-0.0069)÷W

4、按细胞数量计算：

单位定义:在 37℃，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（nmol /min /10^4 cell)= [(ΔA-0.0069) ÷0.0321]÷(500×V1÷V)÷T=0.078×(ΔA-0.0069)

5、液体样本中 G6PDH 活力计算:

单位的定义：在 37℃，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（nmol/min /mL）＝[(ΔA-0.0069) ÷0.0321]÷V1÷T=38.94×(ΔA-0.0069)

V----加入提取液体积，1 mL； V1----加入样本体积，0.04 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℃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 依据加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。