6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6-PGDH）试剂盒说明书

（货号：G0814W 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 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℃ 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

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 25℃,调节波长至 450nm。

② 试剂解冻至室温（25℃）或于水浴锅（25℃）中孵育 15-25min。

③ 在 96 孔板中依次加入：

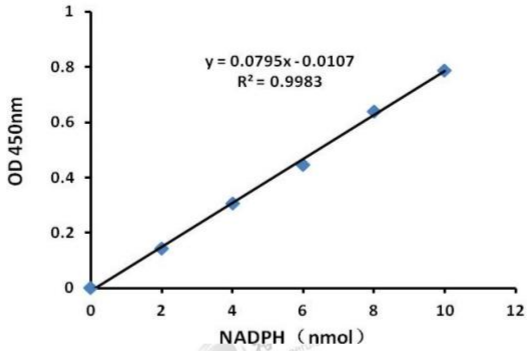
试剂名称（μL）	测定管
样本	20
试剂二	170
试剂三	10
混匀，25℃条件下，立即于 450nm 处读取 A1 值，20min 后读取 A2 值，（观察：酶活性越大，则黄色越明显）。ΔA=A2-A1。	

【注】：若ΔA 小于 0.01，可以延长反应时间 T（如由 20min 延至 60min 或更长）再读取 A2；

或加大样本取样量 W（如增加到 0.2g）；或增加样本加样量 V1（如由 20μL 增至 50μL，则试剂二相应减少），重新调整后的 T 和 W 和 V1 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 的 NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

6PGDH(nmol/min/mg prot)=[(ΔA+0.0107)÷0.0795]÷(Cpr×V1)÷T=31.45×(ΔA+0.0107)÷Cpr

3、按样本质量计算：

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

6PGDH(nmol/min/g 鲜重)=[(ΔA+0.0107)÷0.0795]÷(V1÷V×W)÷T=31.45×(ΔA+0.0107)÷W

4、按细胞数量计算：

酶活定义：每百万细胞每分钟催化产生 1nmol 的 NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

6PGDH(nmol/min/10^4cell)=[(ΔA+0.0107)÷0.0795]÷(V1÷V×500)÷T=31.45×(ΔA+0.0107)÷500

5、按液体体积计算：

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

6PGDH(nmol/min/mL)=[(ΔA+0.0107)÷0.0795]÷V1÷T=31.45×(ΔA+0.0107)

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；

500---细胞数量，万；

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（4nmol/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, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. nmol/μL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3 按照 20μL 标准品+170μL 试剂一+10μL 试剂三，根据结果即可制作标准曲线。