

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6-PGDH) 活性测定试说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

磷酸戊糖途径途径中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PDH) 和 6PGDH 依次催化 NADPH 合成，与能量的平衡、生长速率和细胞活力等密切相关。此外，6PGDH 逆境生理中具有重要作用。

测定原理：

6PGDH 催化 6-磷酸葡萄糖酸和 NADP⁺生成 NADPH，NADPH 在 340 nm 有特征吸收峰，而 NADP⁺没有；通过测定 340nm 吸光度增加速率，计算 6PGDH 活性。

自备仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、酶标仪、96 孔板和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 19mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 避光保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存。

粗酶液提取：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个)：提取液体积 (mL) 为 1000~5000：1 的比例 (建议 2000 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)；8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液)，进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、血清 (浆) 样品：直接检测。

测定操作：

1. 酶标仪预热 30min，调节波长到 340 nm。

2 将试剂二和试剂三转移至试剂一中充分溶解；在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min 以上；用不完的试剂分装后 -20℃ 保存，禁止反复冻融。

3. 取 96 孔板，依次加入 10μL 样本 190μL 试剂一，于 340nm 处测定 3min 内吸光值变化，第 10 s 吸光值记为 A1，第 190s 吸光值记为 A2。ΔA=A2-A1

注意：空白管只需要做一次。

计算公式：

使用 96 孔板测定的计算公式如下

1、血清 (浆) 6PGDH 活力的计算：

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

6PGDH (nmol/min/mL) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 2143.6 \times \Delta A$

2、组织、细菌或细胞中 6PGDH 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 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

6PGDH (nmol/min /mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 2143.6 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本鲜重计算:

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

6PGDH(nmol/min /g 鲜重) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2143.6 \times \Delta A \div W$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

6PGDH (nmol/min /10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.072 \times \Delta A$

V 反总: 反应体系总体积, 1×10⁻³ L; ε: NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10³ L / mol /cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.05 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 3 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 2000: 细菌或细胞总数, 2000 万。