

6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0265

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 25mL×1 瓶	2-8℃保存
粉剂一	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 支	2-8℃保存

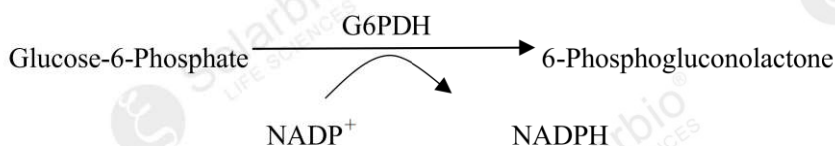
溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前将粉剂一全部加入试剂一中，充分溶解，2-8℃可保存 4 周（切忌放-20℃或者或者贴近冰箱内壁）；
- 2、试剂二：用时每支加 280μL 蒸馏水充分溶解备用，2-8℃可保存 4 周；
- 3、试剂三：用时每支加 280μL 蒸馏水充分溶解备用，2-8℃可保存 4 周；
- 4、工作液的配制：临用前根据样本量按试剂一：试剂二工作液：试剂三=1.35mL：18μL：18μL（共 1.386mL，约 7T）的比例配制成工作液后使用，注意按照样本量现配现用（试剂一先预热 15min 再配制工作液）。

产品说明：

6-磷酸葡萄糖脱氢酶（Glucose-6-phosphate dehydrogenase, 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，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，供生物合成及维持细胞内的还原状态用。因此 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性的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 NADP⁺还原生成 NADPH，在 340nm 下测定 NADPH 增加速率。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）





- 1、细菌、细胞：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（ 10^4 个）：提取液体积（mL）=500-1000:1 的比例（建议 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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 2、组织样本：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。
- 3、血清（浆）样本：直接检测，若有浑浊可离心后取上清测定。

二、测定步骤

- 1、紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 340nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、试剂一置 37℃水浴预热后再配制工作液，工作液无需再次预热。
- 3、加样表：（在微量石英比色皿或者 96 孔 UV 板中加入下列试剂）

试剂名称（μL）	测定管	空白管
工作液	190	190
样本	10	-
蒸馏水	-	10

在微量石英比色皿或者 96 孔 UV 板中依次加入上述试剂，充分混匀 10s，立即测定 340nm 处 10s 时的吸光值 A1，然后迅速置于 37℃水浴锅中反应 5min（酶标仪有控温功能的可将温度调至 37℃），拿出迅速擦干测定 5min10s 时的吸光值 A2。记 ΔA 测定=A2 测定-A1 测定， ΔA 空白=A2 空白-A1 空白。空白管只需做 1-2 次。

三、G6PDH 活性单位的计算

a.用 96 孔 UV 板测定的计算公式如下

1、按液体体积计算：

单位的定义：每毫升血清（浆）每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{G6PDH 活性 (U/mL)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T \times F \\ = 1072 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times F$$

2、按蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{G6PDH 活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \times F \\ = 1072 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr \times F$$

3、按样本质量计算：

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

$$\text{G6PDH 活性 (U/g 质量)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 提取} \times W) \div T \times F \\ = 1072 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W \times F$$

4、按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{G6PDH 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反总}] \div (V \text{ 样本} \times N \div V \text{ 提取}) \div T \times F \\ = 1072 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div N \times F$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；d: 96 孔 UV 板光径，0.6cm；V 反总：反应总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

V 样：加入样本体积，0.01mL；T: 反应时间，5min；V 提取：加入提取液体积，1mL；Cpr: 样本蛋白浓度，mg/mL；

W: 样本质量，g；N: 细菌或细胞总数，以 10^4 计； 10^9 : 单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ ；F: 稀释倍数。



b.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

将上述公式中的 $d=0.6\text{cm}$ 改为 $d=1\text{cm}$ （微量石英比色皿光径）进行计算即可。

注意事项：

- 1、实验时，样本在冰上放置，以免变性和失活。试剂一可根据样本量取部分 37°C 水浴放置。
- 2、微量石英比色皿中反应液的温度必须保持 37°C ，取小烧杯一只装入一定量的 37°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°C 水浴锅中。在反应过程中把微量石英比色皿连同反应液放在此烧杯中。
- 3、最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。
- 4、若样本测定初始值（10s）大于 0.5 而 ΔA 测定小于 0.1，可将样本稀释后再行测定，注意同步修改计算公式。
- 5、使用 96 孔 UV 板测定时，因是根据反应速率计算酶活，为保证每个样本的反应时间尽量一致不推荐同时测过多样本。

实验实例：

- 1、称取约 0.1056g 大鼠肝脏，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。8000g 4°C 离心 10min，取上清，之后按照测定步骤操作，用 96 孔 UV 板测得计算 ΔA 测定管= A_2 测定- A_1 测定= $0.534-0.340=0.194$ ， ΔA 空白管= A_2 空白- A_1 空白= $0.049-0.049=0$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{G6PDH (U/g 质量)} = 1072 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W = 1072 \times 0.194 \div 0.1056 = 1969.39 \text{ U/g 质量}.$$

相关发表文献：

- [1] Ma H, Zhang F, Zhou L, Cao T, Sun D, Wen S, Zhu J, Xiong Z, Tsau MT, Cheng ML, Hung LM, Zhou Y, Li Q. c-Src facilitates tumorigenesis by phosphorylating and activating G6PD. *Oncogene*. 2021 Apr;40(14):2567-2580. doi: 10.1038/s41388-021-01673-0. Epub 2021 Mar 8. PMID: 33686238.
- [2] Tian Y, Li Y, Sun S, Dong Y, Tian Z, Zhan L, Wang X. Effects of urban particulate matter on the quality of erythrocytes. *Chemosphere*. 2023 Feb;313:137560. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.137560. Epub 2022 Dec 13. PMID: 36526140.
- [3] Luo L, Liu Y, Nizigiyimana P, Ye M, Xiao Y, Guo Q, Su T, Luo X, Huang Y, Zhou H. DNA 6mA Demethylase ALKBH1 Orchestrates Fatty Acid Metabolism and Suppresses Diet-Induced Hepatic Steatosis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2022;14(6):1213-1233. doi: 10.1016/j.jcmgh.2022.08.011. Epub 2022 Sep 2. PMID: 36058506; PMCID: PMC9579408.
- [4] Yu J, Wang Z, Wang J, Mohisn A, Liu H, Zhang Y, Zhuang Y, Guo M. Physiological metabolic topology analysis of *Halomonas elongata* DSM 2581T in response to sodium chloride stress. *Biotechnol Bioeng*. 2022 Dec;119(12):3509-3525. doi: 10.1002/bit.28222. Epub 2022 Sep 19. PMID: 36062959.

参考文献：

- [1] Rüdiger Hauschild, Antje von Schaewen. Differential Regulation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Isoenzyme Activities in Potato [J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(1): 47-62.
- [2] Philip E, Pamela J, David I. et al. Methylglyoxal-induced modification of arginine residues decreases the activity of NADPH-generating enzymes [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 61: 229-242.
- [3] Rüdiger Hauschild, Antje von Schaewen. Differential Regulation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Isoenzyme Activities in Potato [J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(1): 47-62.





[4] Philip E, Pamela J, David I. et al. Methylglyoxal-induced modification of arginine residues decreases the activity of NADPH-generating enzymes [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2013, 61: 229-242.

[5] Anderson B M, Wise D J, Anderson C D. Azotobacter vinelandii glucose 6-phosphate dehydrogenase properties of NAD-and NADP-linked reactions[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1997, 1340(2): 268-276.

相关系列产品:

- BC1110/BC1115 NADP 磷酸酶 (NADPase) 活性检测试剂盒
- BC1120/BC1125 NADP 苹果酸酶 (NADP-ME) 活性检测试剂盒
- BC2100/BC2105 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6PGDH) 活性检测试剂盒
- BC0400/BC0405 胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 活性检测试剂盒

