

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6PGDH）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC2105

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
试剂一	液体 60 mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前配制，加入 2.2 mL 试剂一，混匀；
- 2、试剂三：临用前配制，加入 2 mL 试剂一，混匀。

产品说明：

磷酸戊糖途径途径中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（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。

6PGDH 催化 6-磷酸葡萄糖酸和 NADP⁺生成 NADPH，NADPH 在 340nm 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。

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：

低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、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）

称约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一，冰上充分研磨，10000rpm 4℃离心 10min，取上清粗酶液，待测。

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，蒸馏水调零。
2. 试剂一置于 37℃水浴预热 30min 以上。
3. 加样表（在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中依次加入）

试剂名称（μL）	测定管（μL）	空白管（μL）
样本	20	-
蒸馏水	-	20
试剂一	140	140
试剂二	20	20
试剂三	20	20





于 340nm 处测定 3min 内吸光值变化, 第 0s 吸光值记为 A1, 第 180s 吸光值记为 A2。记 ΔA 测定=A2 测定-A1 测定, ΔA 空白=A2 空白-A1 空白。

三、6PGDH 活性计算

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义: 每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} 6PGDH \text{ 酶活性(U/mg prot)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 536 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\begin{aligned} 6PGDH \text{ 酶活性(U/g 质量)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ &= 536 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W \end{aligned}$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 微量石英比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 0.0002L; Cpr : 粗酶液蛋白质浓度, mg/mL, 需要另外测定; V 样: 反应体系中加入粗酶液体积, 0.02mL; V 样总: 提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 3min; W : 样本质量, g。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义: 每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} 6PGDH \text{ 酶活性(U/mg prot)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 893 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\begin{aligned} 6PGDH \text{ 酶活性(U/g 质量)} &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ &= 893 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W \end{aligned}$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 96 孔板光径, 0.6cm; V 反总: 反应体系总体积, 0.0002L; Cpr : 粗酶液蛋白质浓度, mg/mL, 需要另外测定; V 样: 反应体系中加入粗酶液体积, 0.02mL; V 样总: 提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 3min; W : 样本质量, g。

注意事项:

1. 试剂二和试剂三须现配现用, 当天未用完试剂保存在 4°C, 可保存 1 周。
2. 样本处理等过程均需要在冰上进行, 且须在提取当日完成酶活性测定, 粗酶液避免反复冻融;
3. 若样本初始 (0s) 读值大于 0.5 且 ΔA 测定小于 0.1, 可尝试将样本进行稀释后测定。
4. 使用 96 孔板测定时, 可根据样本数量将试剂一 (预热后)、二、三预混为工作液, 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. 称约 0.1g 肾脏组织, 加入 1mL 试剂一, 冰上充分研磨, 10000rpm 4°C 离心 10min, 取上清稀释 5 倍, 用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定=A2 测定-A1 测定=0.4866-0.3035=0.1831, ΔA 空白=A2 空白-A1 空白=0.0325-0.0269=0.0056, 按样本质量计算酶活得:



6PGDH 酶活性(U/g 质量)=536×(ΔA 测定-ΔA 空白)÷W×5 (稀释倍数)=4757 U/g 质量。

相关发表文献:

- [1] Chen YT, Yang KX, Dai ZY, Yi H, Peng XX, Li H, Chen ZG. Repressed Central Carbon Metabolism and Its Effect on Related Metabolic Pathways in Cefoperazone/Sulbactam-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2022 Mar 3;13:847634. doi: 10.3389/fmicb.2022.847634. PMID: 35308347; PMCID: PMC8927769.
- [2] Ou-Yang YN, Yuan MD, Yang ZM, Min Z, Jin YX, Tian ZM. Revealing the Pathogenesis of Salt-Sensitive Hypertension in Dahl Salt-Sensitive Rats through Integrated Multi-Omics Analysis. *Metabolites*. 2022 Nov 7;12(11):1076. doi: 10.3390/metabo12111076. PMID: 36355159; PMCID: PMC9694938.
- [3] Ran Y, Yang Q, Zeng J, Li F, Cao Y, Xu Q, Qiao D, Xu H, Cao Y. Potential xylose transporters regulated by CreA improved lipid yield and furfural tolerance in oleaginous yeast *Saitozyma podzolica* zwy-2-3. *Bioresour Technol*. 2023 Oct;386:129413. doi: 10.1016/j.biortech.2023.129413. Epub 2023 Jun 28. PMID: 37390935.
- [4] Zhu L, Bai C, Wang X, Wei Z, Gu M, Zhou X, Su G, Liu X, Yang L, Li G. Myostatin Knockout Limits Exercise-Induced Reduction in Bovine Erythrocyte Oxidative Stress by Enhancing the Efficiency of the Pentose Phosphate Pathway. *Animals (Basel)*. 2022 Apr 4;12(7):927. doi: 10.3390/ani12070927. PMID: 35405915; PMCID: PMC8996956.
- [5] Li T, Yang W, Xu X, Zhang Y, Chen J, Zou X. Coproduction of polymalic acid and liamocins from two waste by-products from the xylitol and gluconate industries by *Aureobasidium pullulans*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2021 Sep;44(9):1965-1974. doi: 10.1007/s00449-021-02578-8. Epub 2021 May 8. PMID: 33963907.

相关系列产品:

- BC1110/BC1115 NADP 磷酸酶 (NADPase) 活性检测试剂盒
- BC0260/BC0265 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PDH) 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
- BC1120/BC1125 NADP 苹果酸酶 (NADP-ME) 活性检测试剂盒

