

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6 - phosphogluconate dehydrogenase, 6-PGDH) 说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

组成:

产品名称	AE015-50T/48S	Storage
提取液: 液体	60ml	4°C
试剂一: 液体	47.5ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	-20°C避光
试剂三: 粉剂	1 瓶	-20°C
说明书	一份	

自备仪器和用品:

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、1ml 石英比色皿和蒸馏水。

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 (10^4 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°C 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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线: 0518-81263339

官网:<http://www.bio149.com>

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。
2. 将试剂二和试剂三转移至试剂一中充分溶解; 在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 10min 以上; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。
3. 取 1ml 石英比色皿, 依次加入 50μl 样本和 950μl 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。

6PGDH 活性计算公式

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。

$$6PGDH \text{ (nmol/min/ml)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1071.8 \times \Delta A$$

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。

$$6PGDH \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1071.8 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$6PGDH \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1071.8 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$6PGDH \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.536 \times \Delta A$$

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: 比色皿光径, 1cm; 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; C_{pr}: 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。

