6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）试剂盒说明书

分光法 48 样

一、产品说明

6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）是戊糖磷酸途径中的关键限速酶，生成的核糖-5-磷酸（R-5-P）和还原型辅酶Ⅱ（NADPH）在核苷酸、脂质等生物的合成及维持氧化还原的动态平衡中起着至关重要的作用，在植物逆境胁迫响应和生长发育中具有重要意义。

G6PDH 催化 $NADP^+$还原生成 NADPH，NADPH 与特异的显色剂反应，产生在 450nm 处有最大吸收峰的有色物质，通过检测该有色物质在 450nm 的增加速率，进而计算出 G6PDH 酶活性的大小。

二、自备仪器和用品

紫外分光光度计、水浴锅、低温离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵

三、试剂的组成和配制

试剂名称	规格	保存温度	配置方法	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存		
试剂一	液体 48 mL×1 瓶	4℃保存	工作液：将试剂二和试剂三转移至试剂一中充分溶解	用不完的工作液分装后-20℃保存一周，禁止反复冻融。
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存		
试剂三	粉剂×1 支	-20℃保存		
试剂四	液体 3mL×1 支	4℃保存		

四、样本制备

建议正式实验前取 2 个样本做预测定，了解本批样本含量情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

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；取 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：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。

五、测定步骤

1、 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

2、 将配置好的试剂一置于 37℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种)预热 10 分钟

3、 在 1mL 石英比色皿中加入下列试剂

	测定管
上清液（μL）	50
工作液（μL）	950
试剂四（μL）	50
混匀后立即记录 450nm 处初始吸光值 A1 和 5min 后的吸光值 A2，计算 ΔA=A2-A1。	

注意：

1、若△A 的值在零附近，可以适当延长反应时间到 10min10s 读取 A2，改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。

2、若上升趋势不稳定，可以每隔 30S 读取一次吸光值，选取一段线性上升的时间段来参与计算。

六、G6PDH 活力单位的计算

1、标准曲线：y = 0.0348x - 0.0051，R^2 = 0.9998；x 是 NADPH 摩尔质量：nmol,y 是ΔA

2、血清（浆）G6PDH 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。

G6PDH（nmol/min/mL）＝[(ΔA+0.0051)÷0.0348]÷V1÷T

=114.94×(ΔA+0.0051)

2、组织、细菌或细胞中 G6PDH 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。

G6PDH（nmol/min/mg prot）＝[(ΔA+0.0051)÷0.0348]÷(V1×Cpr)÷T

=114.94×(ΔA+0.0051)÷Cpr

（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。

G6PDH（nmol/min/g 鲜重）＝[(ΔA+0.0051)÷0.0348]÷(W×V1÷V)÷T

=114.94×(ΔA+0.0051)÷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。

G6PDH（nmol/min/10^4cell)=[(ΔA+0.0051)÷0.0348]÷(500×V1÷V)÷T

=0.2299×(ΔA+0.0051)

V：加入提取液体积，1 mL；V1：加入样本体积，0.05 mL；W：样本质量，g； T：反应时间，5 min