

6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)试剂盒(WST-8 法)

(微板法 96 样)

产品简介:

6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (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, 同时维持 NADPH 在细胞内的水平, NADPH 反过来维持细胞中谷胱甘肽的水平进而保护细胞免受氧化损伤。因此 G6PDH 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 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, 传统方法是检测 NADPH 在 340nm 处的吸光值。由于 NADPH 的摩尔消光系数 (ϵ) 较低, 所以这种方法灵敏度低, 且严重受到干扰。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法: 该酶促过程产生的 NADPH 与特异的显色剂反应, 产生在 450nm 处有最大吸收峰的可色物质, 通过检测该可色物质在 450nm 的增加速率, 进而计算出 G6PDH 酶活性的大小。

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	临用前加入 19mL 试剂一充分溶解, 用不完的试剂 4℃保存。

试剂三	液体 1.1mL×EP 管	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂

[注]: 粉剂量在 mg 级别, 使用前用手甩几次或者进行离心, 打开直接加入要求的试剂即可。

所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰。

6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PDH) 活性测定:

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

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

[注]: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 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 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 4℃ 约 12,000rpm 离心 10min, 取上清作为待测样品。。

[注]: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清液检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 设置温度 37°C,调节波长至 450nm。

② 试剂放在 37°C水浴 5min;

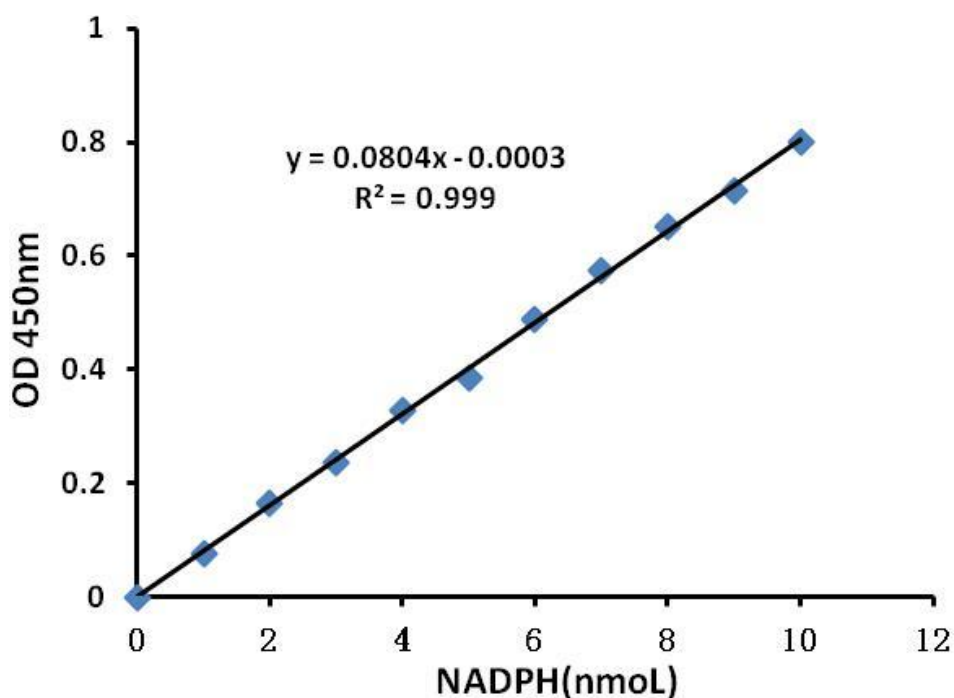
③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样 本	10
试 剂 二	180
试 剂 三	10
混匀, 立即于 450nm 处读取 A1 值, 20min 后读取 A2 值, (观察: 酶活性越大, 则黄色越明显)。ΔA=A2-A1。	

【注】: 若ΔA 过小, 可以延长反应时间 (如: 60min 或更长) 再读取 A2, 或加大样本取样量 (如增加到 0.2g), 重新调整的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 9.4636x - 0.0018$, x 为谷氨酸摩尔浓度 (μmol/mL), y 为ΔA。



2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：在 37℃，每毫克组织蛋白每分钟使 1 nmol 6-磷酸葡萄糖氧化成 1 nmol 6 - 磷酸葡萄糖酸内酯并且使 1 nmol NADP⁺转换成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{G6PDH (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0003) \div 0.0804] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 62.189 \times (\Delta A + 0.0003) \div Cpr。 \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：在 37℃，每克组织每分钟使 1 nmol 6-磷酸葡萄糖氧化成 1 nmol 6 - 磷酸葡萄糖酸内酯并且使 1 nmol NADP⁺转换成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{G6PDH (nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0003) \div 0.0804] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 62.189 \times (\Delta A + 0.0003) \div W。 \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

单位定义:在 37°C, 每 10^4 个细胞每分钟使 1 nmol 6-磷酸葡萄糖氧化成 1 nmol 6-磷酸葡萄糖酸内酯并且使 1 nmol NADP^+ 转换成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6PDH (nmol/min/}10^4\text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.0804] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.1244 \times (\Delta A + 0.0003)$$

5、液体样本中 G6PDH 活力计算:

单位定义: 在 37°C, 每毫升液体每分钟使 1 nmol 6-磷酸葡萄糖氧化成 1 nmol 6-磷酸葡萄糖酸内酯并且使 1 nmol NADP^+ 转换成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{G6PDH (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.0804] \div V1 \div T = 62.189 \times (\Delta A + 0.0003)$$

V----加入提取液体积, 1 mL; V1----加入样本体积, 0.01 mL; W----样本质量, g。

T----反应时间, 20 min; 若加大了反应时间, 则重新调整的反应时间值要代入公式重新计算; Cpr----样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

1 制备标准品母液 (1nmol/ μL): 向标准品 EP 管里面加入 0.6mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20°C保存)。

2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/ μL 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3 依据加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。