

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGDH)试剂盒(WST-8 法)

(微板法 96 样)

产品简介:

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6-PGDH, EC 1.1.1.43) 是磷酸戊糖途径中关键酶之一, 在维持细胞 NADPH 水平上起重要作用, 与生物体能量平衡、生长速率和细胞活力等密切相关。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法: 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶催化 6-磷酸葡萄糖酸和 NADP⁺生成 NADPH。进而与特异显色探针反应生成有色物质, 通过检测该有色物质的增加速率, 计算出 6-PGDH 酶活性大小。

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	用前甩几下使粉剂落入底部 (量少, 勿损失), 再加 17.5mL 试剂一充分溶解, 用不完的试剂 4℃保存。
试剂三	液体 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

所需的仪器和用品:

酶标仪、96孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、和蒸馏水。

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6-PGDH) 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。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 液体样本:

直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 设置温度 25℃, 调节波长至 450nm。

② 试剂解冻至室温 (25℃) ;

③ 在 96 孔板中依次加入:

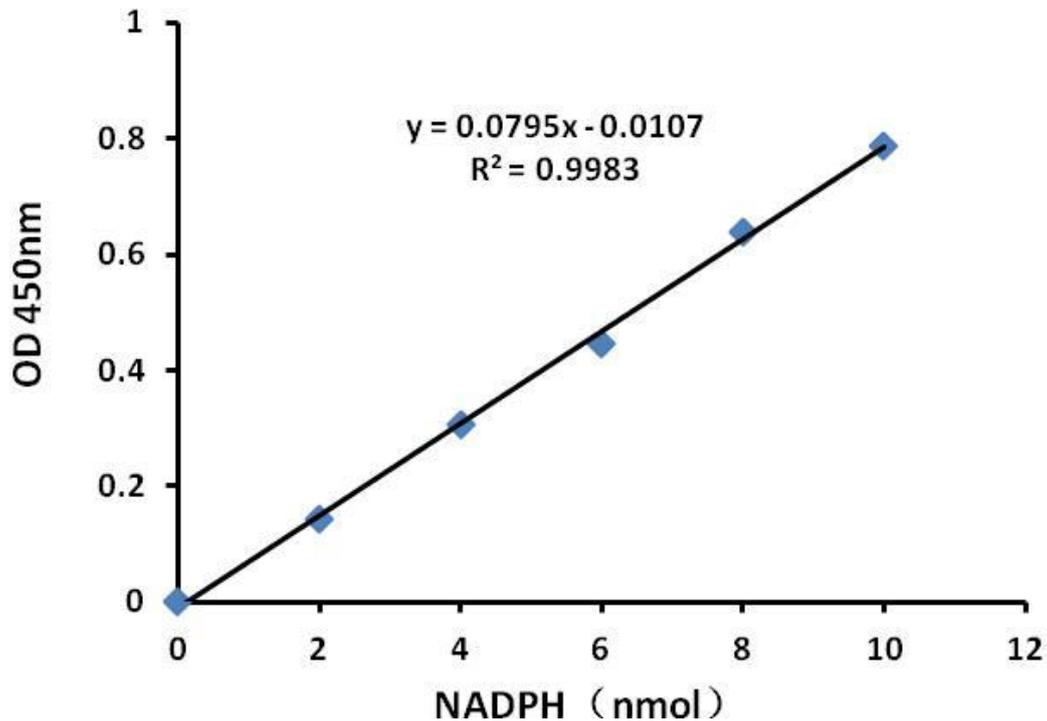
试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	170
试剂二	10

混匀, 25℃条件下, 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 A_2 ，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： $y = 0.0795x - 0.0107$ ， x 是 NADPH 摩尔质量 (nmol) , y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算:

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

$$6PGDH(\text{nmol}/\text{min} / \text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0107) \div 0.0795] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T$$

$$= 31.45 \times (\Delta A + 0.0107) \div \text{Cpr}.$$

3、按样本质量计算:

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

$$6\text{PGDH 酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0107) \div 0.0795] \div (V1 \div V \times W) \div T$$

$$= 31.45 \times (\Delta A + 0.0107) \div W。$$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$6\text{PGDH 酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0107) \div 0.0795] \div V1 \div T$$

$$= 31.45 \times (\Delta A + 0.0107)$$

V----加入提取液体积，1 mL； V1----加入样本体积，0.02 mL；

W----样本质量，g。 T----反应时间，20 min；

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 $^{\circ}\text{C}$ 保存)。

2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. nmol/ μL 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3 按照 20 μL 标准品+170 μL 试剂一+10 μL 试剂三，根据结果即可制作标准曲线。