

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
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	

所需的仪器和用品

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

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 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；取约 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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)；12000rpm 4℃离心 10min，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
-----------	-----

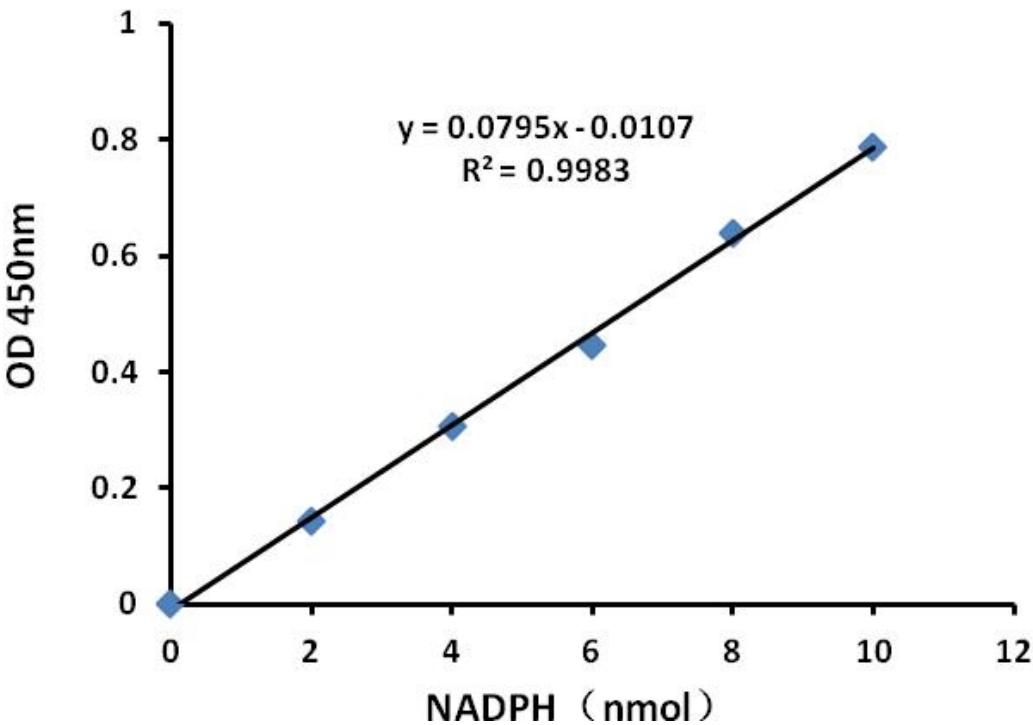
样 本	20
试 剂 一	170
试 剂 二	10
混匀，25℃条件下，立即于 450nm 处读取 A1 值，20min 后读取 A2 值，（观察：酶活性越大，则黄色越明显）。ΔA=A2-A1。	

[注]：若ΔA 过小，可以延长反应时间（如：60min 或更长）再读取 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：

$y = 0.0795x - 0.0107$, 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。

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

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

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