

Alcohol dehydrogenase Activity Assay Kit

6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PDH) 试剂盒说明书

货号:BN72021 | 方法: 微板法 | 规格: 96 样

一、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水平进而保护细胞免受氧化损伤。因此 G6PDH 活性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 与特异显色剂反应产生在 450nm 处有最大吸收峰的可有色物质, 通过检测 450nm 处的增加速率, 进而计算出 G6PDH 酶活性大小。

二、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	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 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。

三、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。

四、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, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

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

② 试剂放在 37℃水浴 5-15min; 在 96 孔板中依次加入:

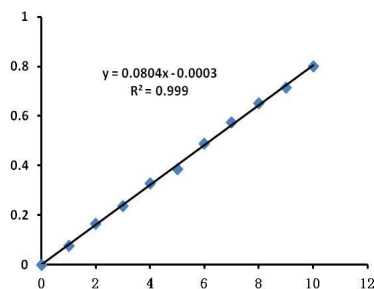
试剂名称 (μ L)	测定管
样本	10
试剂二	180
试剂三	10

混匀, 立即于 450nm 处读取 A1 值, 于 37°C 条件下, 20min
后读取 A2 值, (观察: 酶活性越大, 则黄色越明显)
 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调;
针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0804x - 0.0003$, x 是 NADPH 摩尔质量: nmol, y 是 ΔA 。



标准曲线示意图

说明: 标准曲线由标准品测定获得, 具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 在 37°C, 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。

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

3、按样本鲜重计算:

单位定义: 在 37°C, 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。

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

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。

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

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。

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

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。