

使用说明书

Instruction Manual

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-PGDH)活性检测试剂盒（微量法）

6-PGDH Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

磷酸戊糖途径中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PDH) 和 6PGDH 依次催化 NADP⁺ 合成, 与能量的平衡、生长速率和细胞活力等密切相关。此外, 6PGDH 逆境生理中具有重要作用。

检测原理

6PGDH 催化 6-磷酸葡萄糖酸和 NADP⁺生成 NADPH, NADPH 在 340 nm 有特征吸收峰, 而 NADP⁺没有; 通过测定 340nm 吸光度增加速率, 计算 6PGDH 活性。

产品组成

100T/96S 规格的产品组成如下:

组成	规格	储存条件
CB0004M-A	60mL×2 瓶	4°C保存
CB0004M-B	粉剂×1 瓶	4°C保存
CB0004M-C	粉剂×1 瓶	4°C保存

操作说明

1. 自备用品:

低温离心机、紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液枪、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

2. 试剂预配制:

- 1) CB0004M-B: 临用前加入 2mL CB0004M-A 充分溶解备用。
- 2) CB0004M-C: 临用前加入 2mL CB0004M-A 充分溶解备用。

3. 粗酶液提取:

- 1) 组织: 按照组织质量 (g): CB0004M-A 体积(mL)为 1: 5-10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL CB0004M-A) 进行冰浴匀浆。8000g, 4°C离心 10min, 取上清置冰上待测。
- 2) 细胞: 按照细胞数量 (10⁴ 个): CB0004M-A 体积 (mL) 为 500-1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL CB0004M-A), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 8000g, 4°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
- 3) 血清、培养液等液体: 直接测定。

4. 检测步骤:

- 1) 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。
- 2) CB0004M-A 置于 37°C水浴中保温 30min。
- 3) 按顺序加入下列试剂:

试剂名称	空白管 (μL)	测定管 (μL)
粗酶液		20
蒸馏水	20	
CB0004M-B	20	20
CB0004M-A	140	140
CB0004M-C	20	20

分别迅速混匀后于 340nm 处测定 3min 内吸光值变化, 第 10s 吸光值记为 A 空 1, 第 190s 吸光值记为 A 空 2, ΔA 空白管=A 空 2-A 空 1; 于 340nm 处测定 3min 内吸光值变化, 第 10 s 吸光值记为 A 测 3, 第 190s 吸光值记为 A 测 4, ΔA 测定管=A 测 4-A 测 3。

注: 空白管只需要做 1-2 次。

5. 6PGDH 酶活性计算公式:

1) 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

A. 按样本蛋白浓度计算

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

$$6PGDH (U/mg \text{ prot}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div \epsilon \div d \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T = 535.9 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

B. 按样本质量计算

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

$$6PGDH (U/g) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div \epsilon \div d \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 535.9 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

C. 按细胞数量计算

活性单位定义: 每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$6PGDH (U/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div \epsilon \div d \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 535.9 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

D. 按液体体积计算

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

$$6PGDH \text{ 酶活性}(U/mL) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div \epsilon \div d \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 535.9 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

注: ϵ : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$; d: 比色皿光径, 1 cm; V 反总: 反应体系总体积, 0.0002 L; Cpr: 粗酶液蛋白质浓度, mg/mL, 需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒; V 样: 反应体系中加入粗酶液体积, 0.02 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 3 min。

2) 使用 96 孔板测定的计算公式如下:

A. 按蛋白浓度计算

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

$$6PGDH (U/mg \text{ prot}) = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T = 1071.8 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr$$

B. 按样本质量计算

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

$$6PGDH (U/g) = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 1071.8 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W$$

C. 按细胞数量计算

活性单位定义: 每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$6PGDH (U/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div \epsilon \div d \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1071.8 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

D. 按液体体积计算

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

$6\text{PGDH (U/mL)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div \epsilon \div d \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1071.8 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}})$

注： ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：96 孔板光径，0.5 cm； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.0002 L； C_{pr} ：粗酶液蛋白质浓度，mg/mL，需要另外测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒(C0050)； $V_{\text{样}}$ ：反应体系中加入粗酶液体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：提取液体积，1 mL； T ：反应时间，3 min。

注意事项

1. 样品处理等过程均需要在冰上进行，且须在提取当日完成酶活性测定，粗酶液避免反复冻融。
2. CB0004M-B 和 CB0004M-C 须现配现用，当天未用完试剂保存在 4°C，可保存 2 天。
3. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
4. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

