

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（紫外分光光度法）

6-PGDH Assay Kit (UV Spectrophotometry)

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 NADPH 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 在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。

产品组成及储存条件

50T/48S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0004UV-A	100mL×1 瓶	4℃保存
CB0004UV-B	粉剂×1 瓶	4℃保存
CB0004UV-C	粉剂×1 瓶	4℃保存

操作说明

1. 自备用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪和蒸馏水。

2. 试剂预配制：

- 1) CB0004UV-B：临用前加入 5mL CB0004UV-A 充分溶解备用。
- 2) CB0004UV-C：临用前加入 5mL CB0004UV-A 充分溶解备用。

3. 粗酶液提取：

- 1) 组织：按照组织质量(g)：CB0004UV-A 体积(mL)为 1:5-10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0004UV-A）进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
- 2) 细胞：按照细胞数量（10⁴ 个）：CB0004UV-A 体积（mL）为 500-1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL CB0004UV-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℃，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) 分光光度计预热 30min，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。
- 2) CB0004UV-A 置于 37℃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		100
蒸馏水	100	
CB0004UV-B	100	100
CB0004UV-A	700	700
CB0004UV-C	100	100

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 10s 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) 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。

$$6PGDH (U/mg \text{ prot}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反应} \div \epsilon \div d \times 10^7] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T = 535.9 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

2) 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。

$$6PGDH (U/g) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反应} \div \epsilon \div d \times 10^7] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 535.9 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

3) 按细胞数量计算

活性单位定义: 每 10⁴ 个细胞每分钟催化产生 1nmol NADPH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$6PGDH (U/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反应} \div \epsilon \div d \times 10^7] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 535.9 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

4) 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。

$$6PGDH (U/mL) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反应} \div \epsilon \div d \times 10^7] \div V \text{ 样} \div T = 535.9 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

注: ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10³ L / mol / cm; d: 比色皿光径, 1 cm; V 反应: 反应体系总体积, 0.001 L; Cpr: 粗酶液蛋白质浓度, mg/mL, 需要另外测定, 建议使用 TargetMol 的蛋白质含量测定试剂盒(C0050); V 样: 反应体系中加入粗酶液体积, 0.1 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; 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. CB0004UV-B 和 CB0004UV-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。

