

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-PGDH)活性检测试剂盒说明书

6-PGDH Assay Kit

紫外分光光度法

货号: AK123

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK123-A	100ml×1 瓶	4℃保存
AK123-B	粉剂×1 瓶	4℃保存
AK123-C	粉剂×1 瓶	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 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。

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。

自备用品:

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

试剂预配制:

AK123-B: 临用前加入 5mL AK123-A 充分溶解备用

AK123-C: 临用前加入 5mL AK123-A 充分溶解备用

粗酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g): AK123-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK123-A) 进行冰浴匀浆。8000g, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌: 按照细胞数量 (10⁴ 个): AK123-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL AK123-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。

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. AK123-A 置于 25℃或 37℃水浴中保温 30min。
3. 按顺序加入下列试剂:

试剂名称	空白管 (ul)	测定管 (ul)
粗酶液		100
蒸馏水	100	
AK123-B	100	100
AK123-A	700	700
AK123-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 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:空白管只需要做一次。

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。

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

※ 蛋白定量检测建议使用本公司:BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

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。

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

3. 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。

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

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。

$$\begin{aligned} 6PGDH (\text{nmol/min/mL}) &= [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div \epsilon \div d \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T \\ &= 535.9 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \end{aligned}$$

注: ϵ : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d: 比色皿光径, 1 cm; V 反总: 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, 0.1 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. AK123-B 和 AK123-C 须现配现用,当天未用完试剂保存在 4°C ,可保存 2 天。