

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

微量法

货号: AK124

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK124-A	60ml×2 瓶	4℃保存
AK124-B	粉剂×1 瓶	4℃保存
AK124-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 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/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

试剂预配制:

AK124-B: 临用前加入 2mL AK123-A 充分溶解备用

AK124-C: 临用前加入 2mL AK123-A 充分溶解备用

粗酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g): AK124-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK124-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): AK124-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL AK124-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/酶标仪预热 30min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。
2. AK124-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 (ul)	测定管 (ul)
粗酶液		20
蒸馏水	20	
AK124-B	20	20
AK124-A	140	140
AK124-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。

6PGDH 酶活性计算公式:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

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, 0.0002 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。

b. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 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。

$$\begin{aligned} 6PGDH (U/mg \text{ prot}) &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 1071.8 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div Cpr \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} 6PGDH (U/g) &= [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ &= 1071.8 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W \end{aligned}$$

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。

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

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。

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

ΔA 空白管)

注： ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6220L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5 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, 0.02mL; V 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. AK124-B 和 AK124-C 须现配现用, 当天未用完试剂保存在 4℃, 可保存 2 天。