

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-PGDH)试剂盒

分光法 48 样

产品简介:

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6-PGDH, EC 1.1.1.43) 是磷酸戊糖途径中关键酶之一, 在维持细胞 NADPH 水平上起重要作用, 与生物体能量平衡、生长速率和细胞活力等密切相关。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法: 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶催化 6-磷酸葡萄糖酸和 NADP⁺生成 NADPH。进而与特异显色探针反应生成有色物质, 通过检测该有色物质的增加速率, 计算出 6-PGDH 酶活性大小。

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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 50mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	使用前甩几下使粉剂落入底部 (量少, 勿损失), 再加 17.5mL 试剂一充分溶解, 用不完的试剂 4°C保存。
试剂三	液体 1mL×EP 管	4°C保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、和蒸馏水。

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6-PGDH）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

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 可见分光光度计预热 30min 以上，设置温度 25℃,调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

② 试剂解冻至室温(25℃)：

③ 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	80
试剂一	360
试剂二	340
试剂三	20

混匀，25℃条件下，立即于 450nm 处读取 A1 值，20min 后读取 A2 值，
(观察：酶活性越大，则黄色越明显)。ΔA=A2-A1。

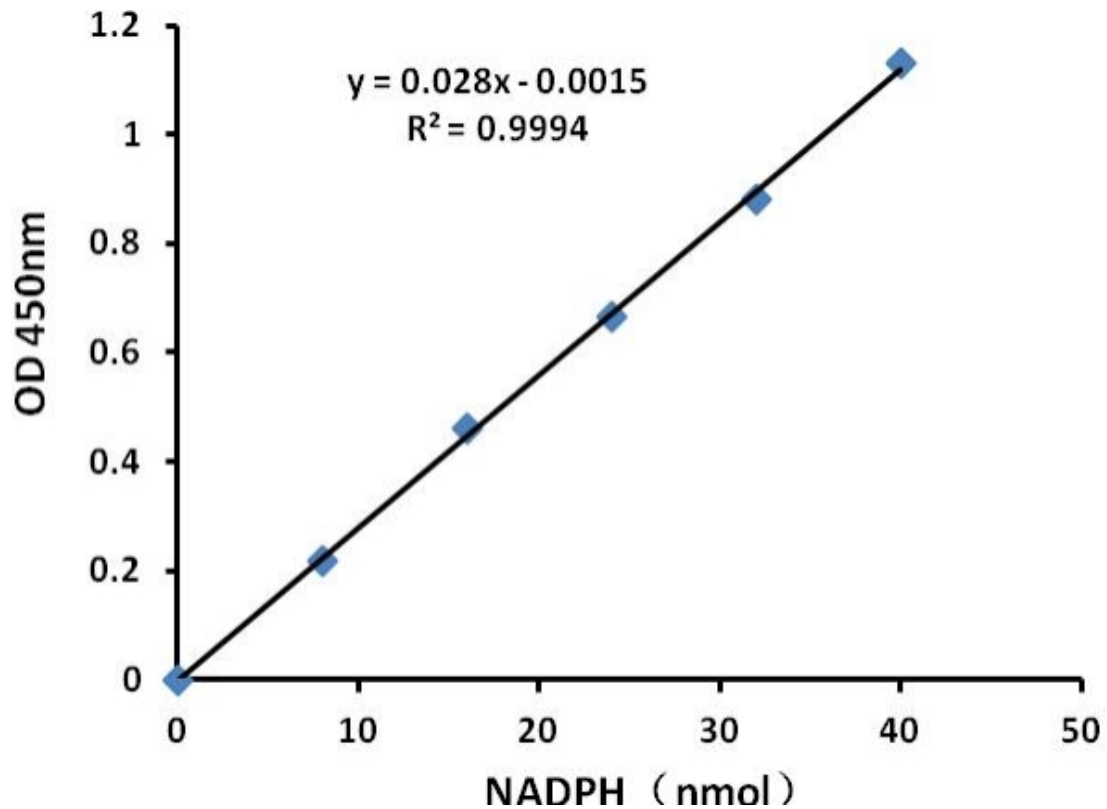
[注]：若ΔA 过小，可以延长反应时间 (如: 60min 或更长) 再读取 A2，或加大样本取样

量 (如增加到 0.2g), 重新调整的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

结果计算:

1、标准曲线方程:

$y = 0.028x - 0.0015$, x 是 NADPH 摩尔质量 (nmol), y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算:

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

$$6\text{PGDH}(\text{nmol}/\text{min} / \text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0015) \div 0.028] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T$$

$$= 22.3 \times (\Delta A + 0.0015) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算:

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

$$\begin{aligned} 6\text{PGDH 酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0015) \div 0.0795] \div V1 \div T \\ &= 22.3 \times (\Delta A + 0.0015) \end{aligned}$$

4、按细菌或细胞密度计算：

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 酶活性

$$\begin{aligned} (\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0015) \div 0.0795] \div V1 \div T \\ &= 22.3 \times (\Delta A + 0.0015) \end{aligned}$$

V----加入提取液体积，1 mL； V1----加入样本体积，0.08 mL；

W----样本质量，g。 T----反应时间，20 min；

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。

附：标准曲线制作过程：

1. 制备标准品母液 (1nmol/ μ L)：向标准品 EP 管里面加入 0.6mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ C保存)。
2. 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. nmol/ μ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
3. 按照 80 μ L 标准品+700 μ L 试剂一+20 μ L 试剂三，根据结果即可制作标准曲线。