



G6PDH 活性检测试剂盒(WST-8 法)

包装清单

Cat No.	组分	包装规格-100T
MCK-0043	反应缓冲液	5.5mL
	G6PDH 底物	220μL
	显色液	220μL
	G6PDH(0.25U/μL)	25μL
	G6PDH 提取液	50mL
	说明书	1 份

产品简介

默科的 G6PDH 活性检测试剂盒(WST-8 法) (G6PDH Activity Assay Kit with WST-8)是一种高灵敏度的基于 WST-8 的显色反应, 通过比色法来检测细胞、组织或其它样品中 G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase)酶活性的检测试剂盒。

WST-8 是 MTT 的一种升级替代产品, 和 MTT 或其他 MTT 类似产品如 XTT、MTS 等相比有明显的优点。首先, MTT 被一些脱氢酶还原生成的 formazan 不是水溶性的, 需要有特定的溶解液来溶解; 而 WST-8 和 XTT、MTS 产生的 formazan 都是水溶性的, 可以省去后续的溶解步骤。其次, WST-8 产生的 formazan 比 XTT 和 MTS 产生的 formazan 更易溶解。再次, WST-8 比 XTT 和 MTS 更加稳定, 使实验结果更加稳定。另外, WST-8 和 MTT、XTT 等相比, 线性范围更宽, 灵敏度更高。WST-8 和 WST-1 相比, 检测灵敏度更高, 更易溶解, 并且更加稳定。

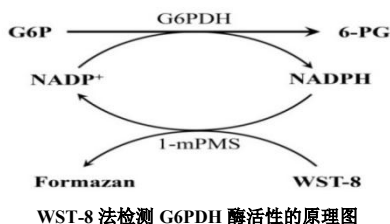
本试剂盒使用便捷。使用细胞、组织等的裂解液即可进行检测, 无需分离纯化细胞、组织或其它样品中的 G6PDH。

本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽。可以每孔含量低至 0.05mU 的 G6PDH, 在 1mU/mL (0.05mU/孔)至 100mU/mL(5mU/孔)之间呈现良好的线性关系。

本试剂盒适用于检测细胞、组织以及其它适当样品(如血液、血清)中的 G6PDH 活性。本试剂盒可以测定 100 个样品。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, 简称 G6PDH 或 G6PD)可催化葡萄糖-6-磷酸(glucose-6-phosphate, G6P)转化为 6-磷酸葡萄糖酸内酯(6-phosphogluconate, 6-PG), 这是磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)的第一个步骤, 也是该途径的限速步骤。磷酸戊糖途径对于 NADPH (还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸, 也称为还原型辅酶 II)和戊糖的生成至关重要。NADPH 对于通过 GSH 的再生来调控氧化还原平衡以及脂肪酸生物合成来说都至关重要。所以 G6PDH 的缺乏会导致由于不能生成 NADPH 而引起的一些疾病, 如新生儿黄疸、非免疫性溶血性贫血等。

本试剂盒可检测样品中的 G6PDH 的酶活性, 具体原理如下: G6P 在 G6PDH 的作用下氧化生成 6-PG, 在这一反应过程中 NADP⁺被还原为 NADPH, 生成的 NADPH 在电子耦合试剂 1-mPMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium Methyl Sulfate)的作用下将 WST-8 还原生成橙黄色的 formazan, 在 450nm 左右有最大吸收峰。反应体系中生成的 formazan 与样品中 G6PDH 的活性呈正比关系。WST-8 法检测 G6PDH 的原理参考下图。



保存条件

-20℃ 保存, 有效期 1 年。显色液须 -20℃ 避光保存。

注意事项

- 经检测本试剂盒中的 G6PDH (细菌来源)室温存放 72 小时或反复冻融 5 次不影响其酶活性。但对于不同物种的 G6PDH 是否能耐受长时间的室温存放或反复冻融须自行测试, 初次检测时尽量使用新鲜制备的样品。
- 由于 G6PDH 提取液本身略粘稠, 以该提取液作为稀释液时, 无论对标准品还是样品进行稀释, 在稀释过程中务必确保稀释均匀, 否则易造成实验数据产生较大波动。
- 在样品加样和混匀过程中, 须尽量避免产生气泡, 以免影响最终的吸光度测定。
- 如果需要测定样品中 G6PDH 的绝对活力而又不能非常严格地控制反应温度和反应时间, 则每次检测都需要设置标准曲线。
- 如果样品溶液中 G6PDH 活性过高或过低, 不在试剂盒的线性检测范围内时, 可适当调整样品或者提取液的用量。



6. 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。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

1. 样品的准备

(1) G6PDH 提取液室温或 37℃ 水浴解冻，解冻后置于冰浴。如果 37℃ 水浴解冻，须注意解冻后立即置于冰浴。

(2) 细胞样品的准备：对于贴壁细胞，约 1×10^6 个细胞(大约相当于 6 孔板一个孔长满的细胞数量)，吸净培养液，用移液器加入 200 μ L 的冰浴预冷的 G6PDH 提取液，并轻轻吹打，以促进细胞的裂解；对于悬浮细胞，收集约 1×10^6 个细胞，600g 离心 5 分钟，吸净培养液，用移液器加入 200 μ L 冰浴预冷的 G6PDH 提取液，并轻轻吹打，以促进细胞的裂解。随后 12,000g，4℃ 离心 5-10 分钟，取上清作为待测样品，冰浴存放备用。

注：裂解过程在冰上或室温操作均可，但以冰浴操作为佳，可以有效减少内源性蛋白酶等导致的酶活性下降。

(3) 组织样品的准备：冰浴预冷的 PBS 洗涤组织后，称取约 10-30mg 的组织样品，用剪刀剪碎，置于匀浆器中，加入 400 μ L 的冰浴预冷的 G6PDH 提取液在冰上或室温进行匀浆。随后 12,000g，4℃ 离心 5-10 分钟，取上清作为待测样品，冰浴存放备用。

注：匀浆过程在冰上或室温操作均可，但以冰浴操作为佳，可以有效减少内源性蛋白酶等导致的酶活性下降。

2. 试剂盒的准备工作

(1) G6PDH 标准品的配制：取 4 μ L G6PDH (0.25U/ μ L，即 250U/mL)和 996 μ L G6PDH 提取液混匀即为 1U/mL G6PDH 标准品。

注：稀释后的 G6PDH 不太稳定，配制后宜尽快使用。

(2) G6PDH 标准曲线的设置：取 200 μ L G6PDH 标准品(1U/mL)用 G6PDH 提取液 3 倍系列稀释(serial dilution)成适当的浓度梯度，如初次检测可以设置 0、1.37、4.1、12.3、37、111、333、1000mU/mL 这几个浓度，检测时 96 孔板每孔加入 50 μ L 的标准品，相当于每孔加入的 G6PDH 的酶量为 0、0.069、0.21、0.62、1.85、5.56、16.7、50mU。如有必要，在后续的实验中可以根据样品中的 G6PDH 活性对标准品的浓度范围进行适当调整。其中浓度为 0mU/mL 的标准品为空白对照 (Blank)，仅含 G6PDH 提取液。

(3) G6PDH 检测液的配制：样品中的 NADPH 等可能会产生一定的背景，建议设置加入样品而不加入 G6PDH 底物的背景对照；对于标准品和样品的 G6PDH 检测液，需要加入 G6PDH 底物。每个背景对照、标准品或样品的检测需要使用 50 μ L 的 G6PDH 检测液，请根据所需检测的背景对照、标准品和样品的数量，配制适量的 G6PDH 检测液，并注意现配现用。G6PDH 检测液的配制方法如下(显色液使用前须适当混匀)：

组分/组别	G6PDH 检测液(背景对照)	G6PDH 检测液(标准品或样品)
反应缓冲液	48 μ L	46 μ L
显色液	2 μ L	2 μ L
G6PDH 底物	/	2 μ L

3. 样品测定

(1) 样品 G6PDH 活性的测定：吸取 50 μ L 待测样品或标准品至 96 孔板中，为了减少实验误差建议设置样品的重复孔。后续如果发现样品中的 G6PDH 活性过高，超过标准品的线性检测范围，则需要用 G6PDH 提取液将样品适当稀释后再进行检测；活性过低时则需要加大细胞或组织样品的用量。

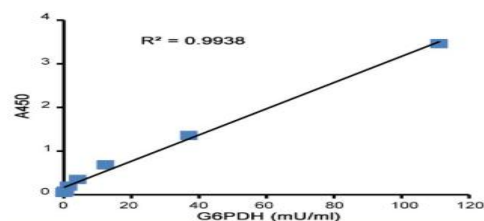
(2) 每孔加入 50 μ L G6PDH 检测液到样品或标准品孔，适当混匀。背景对照孔需要加入 50 μ L 不含 G6PDH 底物的 G6PDH 检测液。在加入 G6PDH 检测液的过程中须轻柔操作，以免产生气泡。若不慎出现气泡，可使用细小的吸头或针头戳破。特别注意：如果样品中的 NADPH 等产生的背景比较高，就必须设置背景对照；初次检测宜设置背景对照。

(3) 37℃ 避光孵育 10 分钟，此时会形成橙黄色的 formazan。测量 450nm 处的吸光度，如果显色较浅，也可以适当延长孵育时间至 15-30 分钟，随着孵育时间的延长显色会越来越深。

4. 样品中 G6PDH 活性的计算

(1) 将标准品和样品的吸光度减去标准品浓度为 0mU/mL 的空白对照(Blank)吸光度。同时，如果背景对照(Background)的吸光度比较高，需要再将所有样品的吸光度减去各自的背景对照的吸光度。

(2) 以 G6PDH 酶活性为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制出标准曲线。G6PDH 标准品的检测效果请参考下图。



本试剂盒检测 G6PDH 的标准曲线图

注：图中 G6PDH 的浓度分别 0、1.37、4.1、12.3、37、111mU/mL，反应时间为 30 分钟。如果适当缩短反应时间，可以在 0-1000mU/mL 的范围内呈现良好的线性关系。不同的检测条件下，实际读数会因标准品的配制、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。



默科南京

Hot line: 025-69867707

(3) 根据标准曲线计算细胞、组织等样品中的 G6PDH 活性。

注: 根据检测得到的活性及样品的体积, 即可计算出 G6PDH 的活力单位。

(4) 如果希望更加精确地来表述 G6PDH 的酶活力, 可以将 G6PDH 提取液制备的细胞或组织样品用 BCA 法测定蛋白浓度。最终用单位蛋白量中 G6PDH 的活力单位来比较精确地进行表述。