

## 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性检测试剂盒 (50T)

### 一般说明

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G<sub>6</sub>PDH)是戊糖磷酸盐途径中的一种细胞膜酶,它通过维持辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐(NADPH)的水平为细胞提供还原能量。G<sub>6</sub>PDH将烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐(NADP)还原成NADPH,同时氧化葡萄糖-6-磷酸(G<sub>6</sub>P)。患有G<sub>6</sub>PDH遗传缺陷的患者容易患非免疫性溶血性贫血。本公司的非放射性比色检测是基于四唑盐MTT在NADH偶联的酶促反应中被还原成MTT的还原形式,在565nm处显示出吸收最大值。在565nm处的吸光度与酶的活性成正比。检测范围:0.2至100 U/L。

### 适用性

测定各种生物样品(如血浆、血清、尿液、组织和培养基)中的G<sub>6</sub>PDH活性。

### 试剂盒组成(96孔板供100份检测)

缓冲液	6mL	心肌黄酶	60 μL
NADP/MTT:	0.5 mL	校准液	1.5 mL
底物	1 mL		

储存:所有试剂均在-20°C保存。

### 检测步骤

这种测定是以动力学反应为基础的。为确保相同的孵化时间,向样品中加入反应试剂的速度要快,搅拌时间要短但要彻底。建议使用多通道移液器。检测可以在任何需要的温度下进行(如25°C或37°C)。

#### 一、样本制备:

血清和血浆直接进行检测。

组织:在解剖前,用磷酸盐缓冲盐水(pH7.4)冲洗组织以去除血液。在含有50mM磷酸二氢钾(pH7.5)的约200μL缓冲液中匀浆组织(50mg)。在4°C下以10,000 x g离心15分钟。取上清液进行检测。

细胞裂解液:在4°C下以2,000 x g离心5分钟,收集细胞。对于粘附细胞,不要用蛋白水解酶来收获细胞,而是用刮除器。在含有50mM磷酸二氢钾(pH7.5)的适当体积的冷缓冲液中匀浆或超声处理细胞。在4°C下以10,000 x g离心15分钟。取出上清液进行检测。

所有样品可在-20°C至-80°C下储存至少一个月。

#### 二、反应试剂准备:

将试剂平衡到所需的反应温度(如25°C或37°C)。在使用前对试剂进行简单的离心。

为所有检测孔准备足够的反应试剂,为每个96孔检测孔混合:8μL底物,8μL NADP/MTT,1μL心肌黄酶和70μL缓冲液。

#### 三、反应:

1. 将100μL水(OD<sub>H<sub>2</sub>O</sub>)和100μL校准液(OD<sub>CAL</sub>)溶液转移到透明平底96孔板的孔中。
2. 将20μL样本转移到不同的孔中,然后在每个样品孔中加入80μL反应试剂。短暂敲击孔板以混合。
3. 在酶标仪上读取OD<sub>565nm</sub>(OD<sub>0</sub>),并在15分钟后再次读取(OD<sub>15</sub>)。



#### 四、计算

从每个样品的OD<sub>15</sub>中减去OD<sub>0</sub>来计算ΔOD<sub>S</sub>值。然后，G<sub>6</sub>PDH活性可按以下方式计算：

$$\begin{aligned} \text{G6PDH} &= \frac{\Delta\text{OD}_S}{\varepsilon_{\text{mtt}} \times l} \times \frac{\text{Reaction Vol } (\mu\text{L})}{t \text{ (min)} \times \text{Sample Vol } (\mu\text{L})} \times n \\ &= \frac{\Delta\text{OD}_S}{\text{OD}_{\text{CAL}} - \text{OD}_{\text{H}_2\text{O}}} \times \frac{273}{t \text{ (min)}} \times n \quad (\text{U/L}) \end{aligned}$$

其中  $\varepsilon_{\text{mtt}}$  是还原MTT的摩尔吸收系数。l是光的路径长度，由校准器计算得出。OD<sub>CAL</sub>和OD<sub>H<sub>2</sub>O</sub>是校准液和水的OD<sub>565nm</sub>（OD<sub>0</sub>）值。t是反应时间（建议时间为15分钟）。反应体积和样品体积分别为100μL和20μL。n是稀释系数。

单位定义：在pH值为8.2时，1个单位（U）的G<sub>6</sub>PDH每分钟可催化1微摩尔NADP向NADPH的转化。

**注意** 如果样品的G<sub>6</sub>PDH活性超过100 U/L，可以使用较短的反应时间，或者将样品在水中稀释，然后重复检测。对于G<sub>6</sub>PDH活性<1 U/L的样品，孵化时间可延长至2小时。

**注意事项：** 本产品仅供研究用，使用过程中应严格遵循实验安全措施。

