P6L100

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性检测试剂盒（100T）

一般说明

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G_6PDH)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_6PDH 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_6P）。患有 G_6PDH 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_6PDH 活性。

试剂盒组成(96 孔板供 100 份检测)

缓 冲 液	10 mL	心肌黄酶	120 µL
NADP/MTT:	1 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℃或37℃）。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_{H2O}）和 100µL 校准液（OD_{CAL}）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_{565nm}（OD_0），并在 15 分钟后再次读取（OD_{15}）。

四、计 算

从每个样品的OD_{15}中减去OD_0来计算ΔOD_S值。然后，G_6PDH活性可按以下方式计算：

$$\text{G6PDH} = \frac{\Delta OD_S}{\varepsilon_{mtt} \times l} \times \frac{\text{Reaction Vol (}\mu\text{L)}}{t\text{ (min)} \times \text{Sample Vol (}\mu\text{L)}} \times n$$

$$= \frac{\Delta OD_S}{OD_{CAL} - OD_{H20}} \times \frac{273}{t\text{ (min)}} \times n \quad (U/L)$$

其中ε_{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_{CAL}和OD_{H20}是校准液和水的OD_{565nm}（ODo）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 G6PDH 每分钟可催化 1 微摩尔 NADP 向 NADPH 的转化。

注意：如果样品的 G_6PDH 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_6PDH 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。