

## G6PDH活性检测试剂盒(WST-8法)

产品编号	产品名称	包装
S0189	G6PDH活性检测试剂盒(WST-8法)	100次

### 产品简介:

- 碧云天的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。
- 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<sup>+</sup>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的原理参考图1。

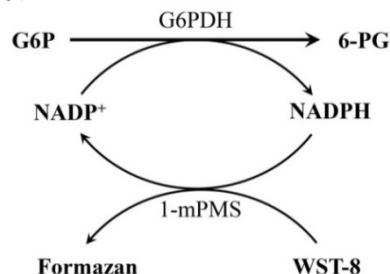


图1. WST-8法检测G6PDH酶活性的原理图。

- 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。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
S0189-1	反应缓冲液	5.5ml
S0189-2	G6PDH底物	220μl
S0189-3	显色液	220μl
S0189-4	G6PDH (0.25U/μl)	25μl
S0189-5	G6PDH提取液	50ml
—	说明书	1份

### 保存条件:

-20°C保存, 一年有效。显色液(S0189-3)须-20°C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提取液本身略显粘稠，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。
- 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。
- 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：

- G6PDH提取液室温或37°C水浴解冻，解冻后置于冰浴。如果37°C水浴解冻，须注意解冻后立即置于冰浴。
- 细胞样品的准备：对于贴壁细胞，约 $1 \times 10^6$ 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 $\mu$ 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 $1 \times 10^6$ 个细胞，600g离心5分钟，吸净培养液，用移液器加入200 $\mu$ 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°C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。
- 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 $\mu$ 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°C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：

- G6PDH标准品的配制：取4 $\mu$ l G6PDH (0.25U/ $\mu$ l，即250U/ml)和996 $\mu$ l G6PDH提取液混匀即为1U/ml G6PDH标准品。注意：稀释后的G6PDH不太稳定，配制后宜尽快使用。
- G6PDH标准曲线的设置：取200 $\mu$ 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 $\mu$ 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。
- 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 $\mu$ 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：

	G6PDH检测液(背景对照)	G6PDH检测液(标准品或样品)
反应缓冲液	48 $\mu$ l	46 $\mu$ l
显色液	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
G6PDH底物	—	2 $\mu$ l

### 3. 样品测定：

- 样品G6PDH活性的测定：吸取50 $\mu$ 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。
- 每孔加入50 $\mu$ 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 $\mu$ 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。
- 37°C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，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：

- 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。
- 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图2。

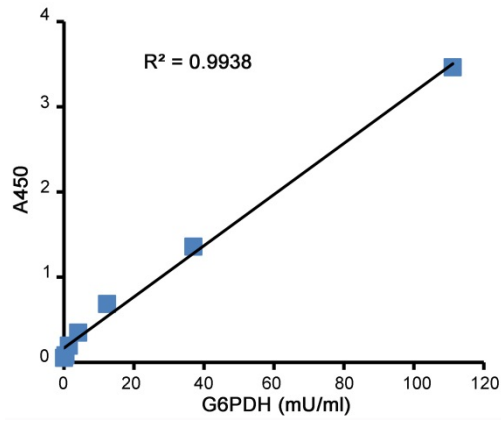


图2. 本试剂盒检测G6PDH的标准曲线。图中G6PDH的浓度分别0、1.37、4.1、12.3、37、111mU/ml，反应时间为30分钟。如果适当缩短反应时间，可以在0-1000mU/ml的范围内呈现良好的线性关系。不同的检测条件下，实际读数会因标准品的配制、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- c. 根据标准曲线计算细胞、组织等样品中的G6PDH活性。  
备注：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。
- d. 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。

Version 2018.07.09