

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⁺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。

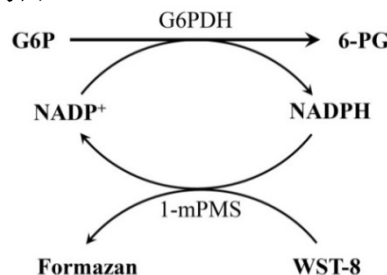


图1. WST-8法检测G6PDH酶活性的原理图。

- 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 1×10^6 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°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 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°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 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 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 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)：

	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：

- 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。
- 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。
- 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，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：

- 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。

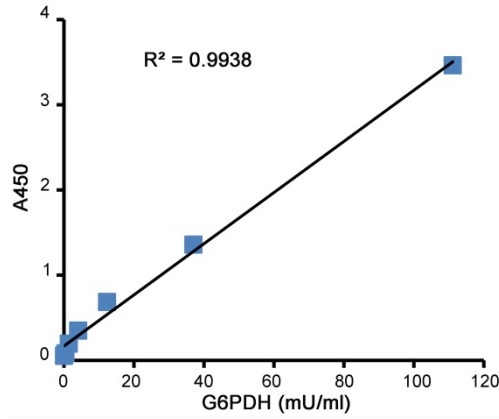


图2. 本试剂盒检测G6PDH的标准曲线。图中G6PDH的浓度分别0、1.37、4.1、12.3、37、111mU/ml，反应时间为30分钟。如果适当缩短反应时间，可以在0-1000mU/ml的范围内呈现良好的线性关系。不同的检测条件下，实际读数会因标准品的配制、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- 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。

使用本产品的文献：

1. Jian Luo, Qiang He, Jin-Zhi Xu, Chen Xu, Yin-Ze Han, Hai-Long Gao, Xian-Zhi Meng, Guo-Qing Pan, Tian Li, Ze-Yang Zhou. Microsporidia infection upregulates host energy metabolism but maintains ATP homeostasis. *J Invertebr Pathol.* 2021 Nov;186:107596.
2. Siyuan Chen, Bo Ning, Jinwen Song, Zihan Yang, Li Zhou, Zhiji Chen, Linhong Mao, Hongtao Liu, Qingliang Wang, Song He, Zhihang Zhou. Enhanced pentose phosphate pathway activity promotes pancreatic ductal adenocarcinoma progression via activating YAP/MMP1 axis under chronic acidosis. *Int J Biol Sci.* 2022 Mar 6;18(6):2304-2316.

Version 2022.08.27