

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。

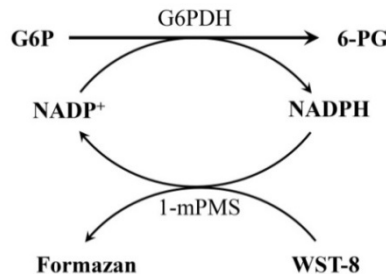


图1. WST-8法检测G6PDH酶活性的原理图。

- 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。
- 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。

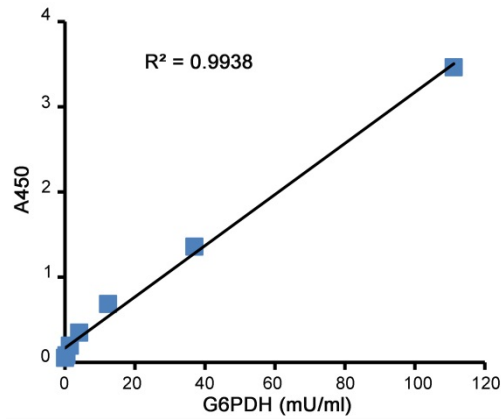


图2. 本试剂盒检测G6PDH的标准曲线。图中G6PDH的浓度分别0、1.37、4.1、12.3、37、111mU/ml，反应时间为30分钟。如果适当缩短反应时间，可以在0-1000mU/ml的范围内呈现良好的线性关系。不同的检测条件下，实际读数会因标准品的配制、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

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. Peina Wang, Yanmei Cui, Yuanyuan Liu, Zhongda Li, Huiyuan Bai, Yashuo Zhao, Yan-Zhong Chang . Mitochondrial ferritin alleviates apoptosis by enhancing mitochondrial bioenergetics and stimulating glucose metabolism in cerebral ischemia reperfusion Redox Biol. 2022 Nov;57:102475.
2. Xin Chen, Na Sun, Rongqin Li, Xuejia Sang, Xueqin Li, Jie Zhao, Jing Han, Jing Yang, Takayuki Ikezoe . Targeting HLA-F suppresses the proliferation of glioma cells via a reduction in hexokinase 2-dependent glycolysis Int J Biol Sci. 2021 Mar 25;17(5):1263-1276.
3. 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.
4. 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.
5. Yichun Gao, Ke Kang, Bin Luo, Xiaoqing Sun, Fang Lan, Jing He, Yao Wu . Graphene oxide and mineralized collagen-functionalized dental implant abutment with effective soft tissue seal and remotely repeatable photodisinfection Regen Biomater. 2022 Apr 29;9:rbac024.
6. Yang Zhou, Shousheng Ni, Congjun Li, Lili Song, Shicui Zhang . Gonadal Rejuvenation of Mice by Growth Differentiation Factor 11 J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2022 May 5;77(5):892-901.
7. Jiahui Xiang, Mokhtar Dabbour, Xianli Gao, Benjamin Kumah Mintah, Yao Yang, Wenbin Ren, Ronghai He, Chunhua Dai, Haile Ma . Influence of Low-Intensity Ultrasound on ε-Polylysine Production: Intracellular ATP and Key Biosynthesis Enzymes during Streptomyces albulus Fermentation Foods. 2022 Nov 5;11(21):3525.
8. Fei Peng, Yu-Han Zhang, Lu Zhang, Man Yang, Chan Chen, Hai Yu, Tao Li . Ketogenic diet attenuates post-cardiac arrest brain injury by upregulation of pentose phosphate pathway-mediated antioxidant defense in a mouse model of cardiac arrest Nutrition. 2022 Nov-Dec;103-104:111814.
9. Xiaohan Jin, Xuexue Li, Lifang Li, Benfu Zhong, Yang Hong, Jing Niu, Binghui Li . Glucose-6-phosphate dehydrogenase exerts antistress effects independently of its enzymatic activity J Biol Chem. 2022 Dec;298(12):102587.

Version 2024.03.12