

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性测定试剂盒(WST-8 法)
Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PDH)
Assay Kit (WST-8 Method)

产品货号: BC00032

产品规格: 100T

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们:

✉ 邮箱 (销售) order@enkilife.cn

✉ 邮箱 (技术支持) tech@enkilife.cn

☎ 公司电话 027-87002838

🌐 网址 www.enkilife.cn



订阅微信公众号
获取更多技术
信息及前沿动态

保质期: 请见试剂盒外包装标签。

技术支持: 为了更好地给您提供服务, 联系时请告知产品外包装标签上批号。

基本信息

产品中文名称	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性测定试剂盒(WST-8 法)
产品英文名称	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PDH) Assay Kit (WST-8 Method)
检测方法	Colorimetric
样品类型	组织、细胞
检测类型	Enzyme activity
检测仪器及波长	酶标仪 (450-490 nm, 最佳检测波长 450nm)
检测范围	0-500mU/mL
灵敏度	0.7962mU/mL

产品简介

G6PDH 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。

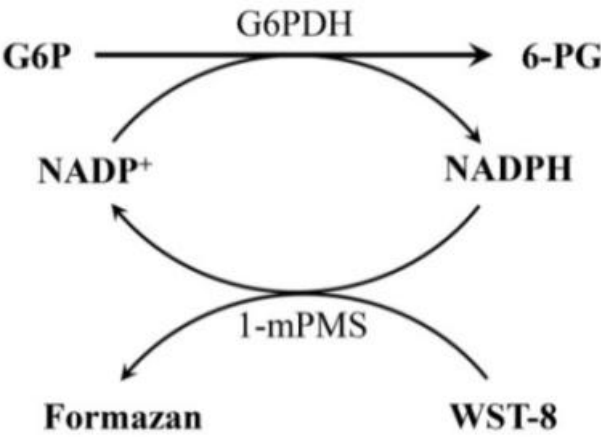
产品特点

- ★ 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。
- ★ 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, 灵敏度高, 线性范围宽。可以每孔含量低至 0.05mU 的 G6PDH,

1mU/ml(0.05mU/孔)至 500mU/ml(25mU/孔)之间呈现良好的线性关系。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。

检测原理

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-methylphenaziniumMethylSulfate)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 的原理参考下图：



产品组分

编号	产品名称	包装规格 (100T)	保存方式
试剂一	反应缓冲液	5.5ml	-20℃
试剂二	G6PDH底物	220μl	-20℃
试剂三	显色液	220μl	-20℃，需避光保存。
试剂四	G6PDH(0.25U/μl)	25μl	-20℃
试剂五	G6PDH提取液	50ml	-20℃
耗材一	96 孔酶标板	1 板	RT
耗材二	96 孔覆膜	2 张	RT

保存条件

未拆封的试剂盒可在 -20℃保存 12 个月。

实验前准备

• 样品处理

1. G6PDH 提取液室温或 37℃ 水浴解冻，解冻后置于冰浴。如果 37℃ 水浴解冻，须注意解冻后立即置于冰浴。
2. 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℃ 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。
3. 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℃ 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。

• 试剂盒的准备工作

1. 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。
2. 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 不同浓度的标准品，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。

3. 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 50μl 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)：

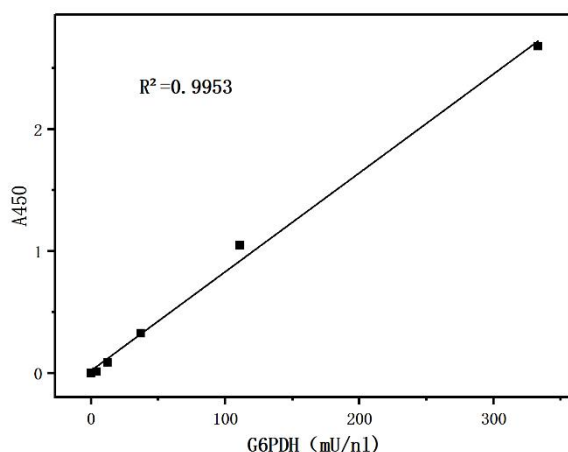
	G6PDH 检测液(背景对照)	G6PDH 检测液(标准品或样品)
反应缓冲液	48μl	46μl
显色液	2μl	2μl
G6PDH 底物	--	2μl

操作流程

1. 样品 G6PDH 活性的测定：吸取 50μl 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。
2. 每孔加入 50μlG6PDH 检测液到样品或标准品孔，适当混匀。背景对照孔需要加入 50μl 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。
3. 37℃ 避光孵育 10 分钟,此时会形成橙黄色的 formazan。测量 450nm(450nm-490nm 均可，450nm 处最佳) 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。

结果计算

1. 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。
2. 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下图:



图中 G6PDH 的浓度分别 0、1.37、4.1、12.3、37、111、333mU/ml, 反应时间为 10 分钟。如果适当缩短反应时间, 可以在 0-500mU/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。

3. 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。
4. 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 EnkiLife 生产的蛋白浓度测定试剂盒(BCA 法)(BC00006)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。

注意事项

1. 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。

2. 由于 G6PDH 提取液略显粘稠，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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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。