（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K1150-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(440-460 nm)

Elabscience®6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6-PGDH）比色法测试盒

6-Phosphogluconate Dehydrogenase (6-PGDH) Activity Colorimetric Assay Kit

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：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动植物组织以及细胞样本中 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-PGDH)的活性。

检测原理

6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-Phosphogluconate Dehydrogenase, 6-PGDH)是磷酸戊糖途径的限速酶，主要负责催化 NADPH 生成、能量的平衡、生长速率和细胞活力等。6-PGDH 还与多种肿瘤信号通路相关，包括表皮生长因子信号通路和核因子 E2 相关因子信号通路等。

本试剂盒的作用原理为 6-PGDH 催化底物生成的产物与显色剂反应生成显色物质在 450 nm 处有最大吸收，通过测定 450 nm 处的 OD 值大小计算 6-PGDH 酶活。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20℃避光保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	0.55 mL×1 支	1.1 mL×1 支	-20℃避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	辅酶 (Coenzyme)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃避光保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	-20℃避光保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	标准品 (Standard)	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20℃避光保存 6 个月
	酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪（440-460 nm，最佳检测波长 450 nm）、恒温箱

试剂：PBS(0.01 M，pH 7.4)

试剂准备

① 检测前，所有试剂需平衡至25 ℃待用。

② 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三粉剂用850 μL双蒸水溶解得到试剂三工作液，未使用完的试剂三工作液可-20 ℃避光保存一周。

③ 工作液的配制：

将试剂一：试剂二：试剂三工作液：试剂四按25：2：3：10体积比混匀，避光待用，现配现用，当天有效。

④ 1000 μmol/L标准品的配制：

取一支试剂五粉剂用750 μL双蒸水溶解得到1000 μmol/L标准品，未使用完的1000 μmol/L标准品可-20 ℃避光保存一周。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	**0**	**50**	**100**	**200**	**400**	**600**	**800**	**1000**
1000 μmol/L 标准品(μL)	0	10	20	40	80	120	160	200
双蒸水(μL)	200	190	180	160	120	80	40	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：直接测定。

组织样本：按组织样本质量(g)：PBS(0.01 M，pH 7.4) (mL) = 1：9的比例进行匀浆，例如：0.1 g组织样本，加入0.9 mL PBS(0.01 M，pH 7.4)匀浆。4 ℃，10000 ×g离心10 min，取上清液，置于冰上待测，当天检测有效。

细胞样本：取1×10^6个细胞加入200 μL PBS(0.01 M，pH 7.4)进行匀浆，4 ℃，10000 ×g离心10 min，取上清液，置于冰上待测，当天检测有效。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2 - 3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：1.26-101.85 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	1-10	10%玉米组织	1-10
10%小鼠肌肉组织	1-10	1×10^6 个 Hela 60 细胞	2-10
10%小鼠心组织	1-10	1×10^6 个 293T 细胞	8-25
10%小鼠脑组织	1-10	大鼠血浆	不稀释
10%小鼠肾组织	2-10	胎牛血浆	不稀释
10%西蓝花组织	不稀释	人血清	不稀释
10%土豆组织	不稀释		

注：稀释液为 PBS(0.01 M，pH 7.4)。

操作步骤

① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液，分别加入相应的酶标孔中；测定孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

② 向步骤①中的各孔中加入 200 μL 工作液。

③ 振板 5 s，酶标仪于 450 nm 处检测测定孔吸光度值 A_1。37 ℃ 孵育 10 min，酶标仪于 450 nm 处检测各孔吸光度值 A_2(标准曲线按 A_2 值计算)。

操作表

	标准孔	**测定孔**
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
工作液(μL)	200	200
振板 5 s，酶标仪于 450 nm 处检测测定孔吸光度值 A_1，37 ℃ 孵育 10 min，450 nm 处再次检测各孔吸光度值 A_2(标准曲线按 A_2 值计算)。		

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax + b

血清(浆)样本中 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-PGDH)活力计算公式：

定义：37℃条件下，每升血浆(清)每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶活为一个活力单位。

$$\text{6-PGDH 活力 (U/L)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \times f$$

组织样本中 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-PGDH)活力计算公式：

定义：37℃条件下，每克组织每分钟催化底物产生 1 nmol 的产物所需要的酶活为一个活力单位。

$$\text{6-PGDH 活力 (U/g wet weight)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \times V_1 \div m \div T \times f \times 1000$$

细胞样本中 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-PGDH)活力计算公式：

定义：37℃条件下，每 1×10^6 个细胞每分钟催化底物产生 1 nmol 的产物所需要的酶活为一个活力单位。

$$\text{6-PGDH 活力 (U/10^6)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \times V_2 \div n \div T \times f \times 1000$$

注解：

y：标准品 A_2 值-空白 A_2 值(标准品浓度为 0 时的 A_2 值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔA_{450}：测定孔 OD 变化值，A_2-A_1

T：反应时间，10 min

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

V_1：组织匀浆液体积，0.0009 L

m：组织重量，0.1 g

V_2：细胞匀浆液体积，0.0002 L

n：细胞样本的个数，1 ×10^6 个

1000：1 μmol/L = 1000 nmol/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

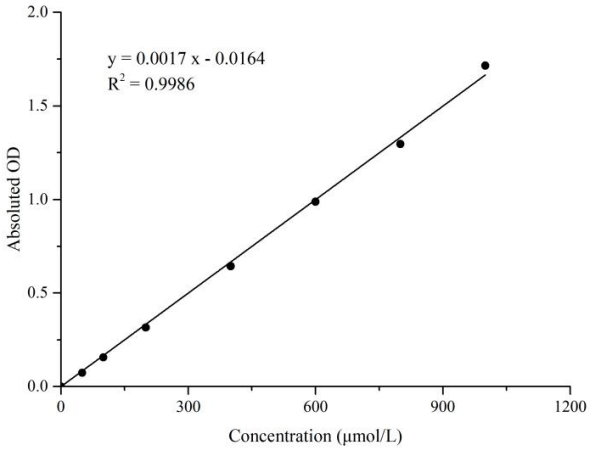
检测范围	1.26-101.85 U/L	批间差	5.9-9.4%
灵敏度	1.26 U/L	批内差	2.9-4.6%
稀释回收率	95-105%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 (μmol/L)	0	50	100	200	400	600	800	1000
A_2值	0.109	0.181	0.263	0.425	0.752	1.094	1.413	1.834
	0.107	0.182	0.265	0.423	0.751	1.098	1.396	1.812
平均 A_2值	0.108	0.182	0.264	0.424	0.752	1.096	1.405	1.823
绝对 A_2值	0.000	0.074	0.156	0.316	0.644	0.988	1.297	1.715

② 绘制标曲(如下图)：



附录2 实例分析

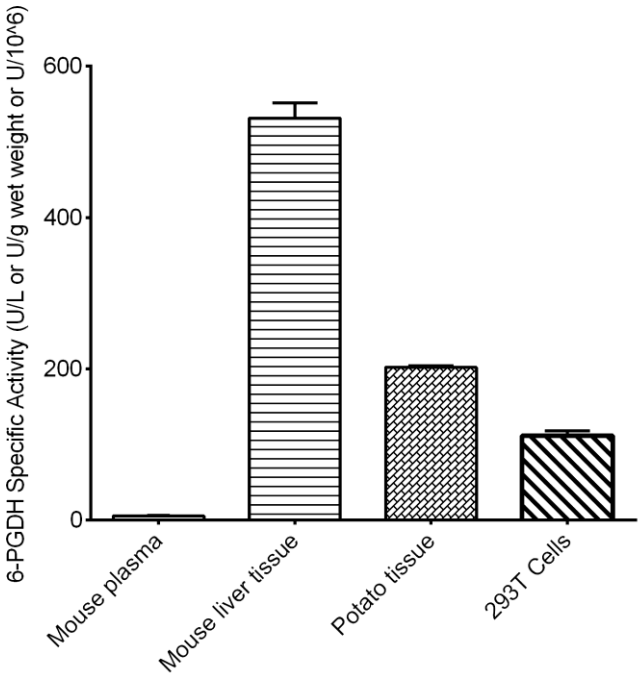
例如检测小鼠肾组织(数据仅供参考):

取 20 μL 稀释 5 倍的 10%小鼠肾组织匀浆上清液，按操作表操作，结果如下：标准曲线：y = 0.002x - 0.0117，测定孔初始吸光度值 A_1 为 0.21，反应 10 min 后测得吸光度值 A_2 为 0.5，$\Delta A_{450} = A_2 - A_1 = 0.5 - 0.21 = 0.29$。计算结果为：

$$\text{6-PGDH 活力(U/g wet weight)} = (0.29 + 0.0117) \div 0.002 \times 0.0009 \div 0.1 \div 10 \times 5 \times 1000$$

$$= 678.83 \text{ U/g wet weight}$$

按说明书操作，测定小鼠血浆(加样量 20 μL)、小鼠肝脏(10%组织匀浆，加样量 20 μL)、土豆(10%组织匀浆，加样量 20 μL)、293T 细胞((1×10^6 个，稀释 5 倍，加样量 20 μL)中得 6-PGDH 活力如下图：



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。