

叶绿体 3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADPH-GAPDH)试剂盒说明书

(货号: G0608F 分光法 24 样)

一、产品简介:

3-磷酸甘油醛脱氢酶分为胞质型和质体型, 植物叶绿体中的 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (EC 1.2.1.13) 属于是质体型, 多以 NADPH 为辅酶, 催化糖酵解的逆反应, 将 1,3 二磷酸甘油酸还原为 3 磷酸甘油醛, 该酶在同化 CO₂ 的卡尔文循环中起中心作用。

利用 GAPDH 逆向催化 1,3 二磷酸甘油酸和 NADPH 生成 3 磷酸甘油醛和 NADP⁺, 于 340nm 处测定 NADPH 的下降速率即可得出叶绿体中 NADPH-GAPDH 酶活性的高低。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
提取液二	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 每支加 0.4mL 蒸馏水溶解, 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂三	液体 μL×1 支	-20℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。可-20℃分装冻存。
试剂四	液体 18mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 0.6mL×1 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、天平、震荡仪、水浴锅、低温离心机、研钵。

四、叶绿体 3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADPH-GAPDH)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.2g 样本, 加入 1mL 提取液一, 快速冰浴匀浆后于 4℃, 1600rpm 离心 5min, 弃沉淀, 取上清再 4℃, 5000rpm 离心 15min, 弃上清留沉淀, 向沉淀中加 1mL 提取液二, 强力涡旋震荡 15s, 置于冰上(或冰箱)孵育 15min, 在 4℃, 13000rpm 离心 5min, 取上清测定叶绿体中 3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADPH-GAPDH)的酶活性。提示: 整个叶绿体的提取过程须保持 4℃ 低温环境。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 液体样品: 澄清的液体样本直接检测; 若浑浊则离心后取上清液检测。

2、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min, 调节波长至 340nm, 设定温度 25℃, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃), 或可放在 25℃ 条件下水浴 5-15min。

③ 试剂一和二和三和四可按照 20:20:20:580 比例配成混合液 (一枪加 640μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。

④ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	60
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	580
混匀，室温（25℃）条件下，孵育 10min	
试剂五	20
轻轻混匀，室温（25℃）条件下，30s 时于 340nm 处读取吸光值 A1，10min 后再读取 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

【注】1. 若 ΔA 小于 0.01，可以适当延长反应时间到 20min 后读取 A2，改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量（如 100μL，则试剂四相应减少），则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

2. 若下降趋势不稳定，可以每隔 20S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

3. 若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4℃离心 10min，上清液用于检测；

4. 若 ΔA 的值大于 0.5，则需减少反应时间（如减少至 5min），或减少样本量（如 40μL），则改变后的反应时间 T 和样本量 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADPH-GAPDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 193 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按照样本质量计算：

酶活定义：每克组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADPH-GAPDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 193 \times \Delta A \div W$$

3、按照液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADPH-GAPDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 193 \times \Delta A$$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ ；

d---比色皿光径，1cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.06mL；

V2---反应体系总体积，0.72mL= $7.2 \times 10^{-4} \text{L}$ ；

T---反应时间，10min；

W---样本质量，g

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。