

叶绿体 3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADPH-GAPDH)试剂盒说明书

(货号: G0609F 分光法 48 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 50mL×1 瓶	4°C保存	
提取液二	液体 50mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4°C保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×3 支	-20°C保存	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°C保存,禁止反复冻融,三天内用完。
试剂三	液体 μL×1 支	-20°C保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。可-20°C分装冻存。
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	液体 1.1mL×1 支	4°C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°C, 1600rpm 离心 5min,弃沉淀,取上清再 4°C, 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°C, 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°C 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°C,蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温(25°C),或可放在 25°C 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 $^{\circ}\text{C}$ ）条件下，孵育 10min	
试剂五	20
轻轻混匀，室温（25 $^{\circ}\text{C}$ ）条件下，30s 时于 340nm 处读取吸光值 A1，10min 后再读取 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。	

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。