

3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADH-GAPDH)试剂盒说明书

(货号: G0843F 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, 细胞质中的 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (EC 1.2.1.12) 是糖酵解的中枢环节之一, 特异的以 NADH 为辅酶, 催化 3 磷酸甘油醛形成 1,3 二磷酸甘油酸的可逆反应, 与糖异生途径及体内血糖浓度的维持、糖尿病的发生密切相关, 在机体糖、脂、蛋白代谢紊乱疾病中发挥重要作用。

本试剂盒耦联 3-磷酸甘油酸激酶, 以三磷酸甘油酸为底物, 于 340nm 处测定 NADH 的下降速率来得出 NADH-GAPDH 酶活性的大小。

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 | 液体 30mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 粉剂 mg×1 支 | 4°C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°C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°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 | 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°C分装冻存。 |
| 试剂四 | 液体 18mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂五 | 液体 0.6mL×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、3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADH-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 0.1g 组织样本, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【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 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为 500~1000:1 比例提取。

③ 液体样本 (如血清): 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

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°C）条件下，孵育 10min | |
| 试剂五 | 20 |
| 轻轻混匀，室温（25°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 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

2、按照样本质量计算：

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

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

3、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每一万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GAPDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.39 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算：

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

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

ϵ ---NADH 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， $0.72\text{mL}=7.2 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

T ---反应时间，10min；

W ---样本质量，g；

500---细菌或细胞数量，万；

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。