

3-磷酸甘油醛脱氢酶(NADH-GAPDH)试剂盒说明书

(货号: G0844W 微板法 96 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 100mL×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 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×3 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 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 16mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	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 1.1mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、天平、震荡仪、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℃ 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℃ 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 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例提取

取

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min, 调节波长至 340nm, 设定温度 25℃。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	140
混匀, 室温 (25℃) 条件下, 孵育 10min	
试剂五	10
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, ΔA=A1-A2。	

- 【注】** 1. 若 ΔA 的值在零附近, 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 40μL, 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 10μL), 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 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GAPDH (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 321.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{NADH-GAPDH (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 321.6 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{NADH-GAPDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

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

d---比色皿光径, 0.5cm;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

V2---反应体系总体积, $0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$;

T---反应时间, 10min;

W---样本质量, g

500---细菌或细胞数量, 500 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。