

3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号: BC2210

规格: 25T/24S、50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称/规格	25T	50T	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂二	液体 25 mL×1 瓶	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 15 μL×1 瓶	液体 30 μL×1 瓶	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂三：液体置于试剂瓶内 EP 管中。根据用量按照试剂三:蒸馏水为 3:100 的体积比例充分混匀，现用现配。
- 2、工作液的配制：将试剂二全部倒入试剂一瓶中，充分溶解，根据需要取一定的量 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）预热 10min；用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融。

产品说明：

GAPDH (EC1.2.1.12)催化 3-磷酸甘油醛氧化生成 1,3-二磷酸甘油酸，是糖酵解途径的关键酶，与糖异生途径、体内血糖浓度的维持和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。

3-磷酸甘油酸激酶催化三磷酸甘油酸和 ATP 生成 1,3-二磷酸甘油酸。GAPDH 逆向催化 1,3-二磷酸甘油酸和 NADH 生成 3-磷酸甘油醛、无机磷和 NAD⁺，340nm 处测定 NADH 的减少量可反映 GAPDH 活性的高低。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、1mL 石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆，然后 8000g，4°C，离心 20min，取上清，置冰上待测。

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

血清（浆）：直接检测。

二、测定步骤

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、操作表（在 1mL 石英比色皿中分别加入下列试剂）：

试剂名称	空白管	测定管
样本（ μL ）		30
蒸馏水（ μL ）	30	
试剂三（ μL ）	20	20
工作液（ μL ）	950	950

在 1mL 石英比色皿中分别加入上述试剂，充分混匀后于 340nm 处测定 10s 时的吸光值 A1，迅速置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其他物种）水浴 5min，拿出迅速擦干测定 5min10s 时的吸光值 A2，计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管。（空白管只需做 1-2 次）

三、GAPDH 酶活计算

1、按样本蛋白浓度计算

酶活定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GAPDH 酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1072 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2、按样本质量计算

酶活定义：每 g 组织每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GAPDH 酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 1072 \times \Delta A \div W$$

3、按照细菌或细胞数量计算

酶活定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GAPDH 酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.14 \times \Delta A$$

4、按照血清（浆）体积计算

酶活定义：每 mL 样本每分钟每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GAPDH 酶活 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 1072 \times \Delta A$$

ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.001L; $V_{\text{样}}$: 反应体系中样本体积, 0.03mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL, 蛋白浓度请自行测定; W : 样本质量, g; T : 反应时间; 5min; 500: 细菌或细胞总数, 500 万; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

注意事项：

- 1、当 A1 小于 0.8 或 ΔA 大于 0.7 时，建议将样本稀释后再进行测定。
- 2、空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过 0.01。

实验实例：

1. 取 0.1g 兔肾脏加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，然后 8000g, 4°C，离心 20min，取上清置冰上，之后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=0.815-0.158=0.657， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.865-0.864=0.001， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.656，按样本质量计算酶活得：
GAPDH 酶活 (U/g 质量) = $1072 \times \Delta A \div W = 7032.32 \text{ U/g 质量}$ 。
2. 取 0.1g 三叶草加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，然后 8000g, 4°C，离心 20min，取上清置冰上，之后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=1.026-1.017=0.009， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.865-0.864=0.001， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.008，按样本质量计算酶活得：
GAPDH 酶活 (U/g 质量) = $1072 \times \Delta A \div W = 85.76 \text{ U/g 质量}$ 。

相关系列产品:

BC0990/BC0995 植物叶绿素含量检测试剂盒

BC4330/BC4335 植物类胡萝卜素含量检测试剂盒

