

3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC2215

规格: 100T/96S

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	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	4℃保存
试剂三	液体 12 μL×1 瓶	4℃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℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）预热 10min；用不完的试剂分装后-20℃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/酶标仪、低温离心机、水浴锅、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、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℃，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℃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/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、操作表（在微量石英比色皿或 96 孔板中分别加入下列试剂）：

试剂名称	空白管	测定管
样本（ μL ）		6
蒸馏水（ μL ）	6	
试剂三（ μL ）	4	4
工作液（ μL ）	190	190

在微量石英比色皿/96孔UV板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）水浴或培养箱5min（酶标仪有控温功能可将温度调至37°C或25°C），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：

A、按石英比色皿计算：

(1) 按蛋白浓度计算

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) 按液体体积计算

酶活定义：每 mL 样本每分钟消耗 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, 1 cm ; V 反总: 反应体系总体积, 0.0002 L ; V 样: 反应体系中样本体积, 0.006 mL ; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL ; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL , 蛋白浓度需自行测定; W : 样本质量, g ; T : 反应时间: 5 min ; 500 : 细菌或细胞总数, 500 万; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

B、按 96 孔 UV 板计算：

将上述公式中的 $d=1 \text{ cm}$ 改为 $d=0.6 \text{ cm}$ （96 孔板光径）进行计算即可。

注意事项：

- 1、当 A1 小于 0.8 或 ΔA 大于 0.7 时（96 孔板为 A1 小于 0.4 或 ΔA 大于 0.4），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 0.02。

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，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管= A1 测定-A2 测定=0.9333-0.2289=0.7044, ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.9322-0.9274=0.0048, $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.6996, 按样本质量计算酶活得：
GAPDH 酶活 (U/g 质量) = $1072 \times \Delta A \div W = 7499.7 \text{ U/g 质量}$ 。

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，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=1.0184-1.0042=0.0142， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.9322-0.9274=0.0048， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.0094，按样本质量计算酶活得：
GAPDH 酶活 (U/g 质量) = $1072 \times \Delta A \div W = 100.77$ U/g 质量。
3. 取兔血清直接检测，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=0.9528-0.9303=0.0225， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.9322-0.9274=0.0048，按血清（浆）体积计算酶活得：
GAPDH 酶活 (U/mL) = $1072 \times \Delta A = 18.974$ U/mL。

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

