



3-磷酸甘油醛脱氢酶活性检测试剂盒

GAPDH Assay Kit

微量法

产品编号: AK505M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES505-1	100mL×1 瓶	4℃保存;
ES505-2	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK505-A	粉剂×1 瓶	-20℃保存;
AK505-B	20mL×1 瓶	4℃保存;
AK505-C	14uL×1 支	4℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 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。

原理: 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。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

样本的前处理:

- 总 GAPDH 酶提取:** 建议称取约 0.1g 样本, 加入 1mL ES505-1, 冰浴匀浆后超声破碎 (冰浴, 200W, 破碎 3s, 间歇 7s, 总时间 1min), 然后 4℃, 8000g 离心 10min, 取上清测定。
- 胞浆和叶绿体 GAPDH 酶的分离:** 按照植物组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 样本, 加入 1mL ES505-1), 冰浴匀浆后于 4℃, 200g 离心 5min, 弃沉淀, 取上清在 4℃, 8000g 离心 10min, 取上清用于测定胞浆 GAPDH 酶活性, 取沉淀加 1mL ES505-2, 震荡溶解后超声破碎 (冰浴, 200W, 破碎 3s, 间歇 7s, 总时间 1min), 然后 4℃, 8000g 离心 10min, 取上清测定叶绿体中 GAPDH 酶活性。
- 建议测定总 GAPDH 酶活性, 按照步骤 1 提取粗酶液, 若需要分别测定胞浆和叶绿体中的 GAPDH, 则按照步骤 2 提取粗酶液。**
- 细菌或培养细胞的前处理:** 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 (10^4 个): ES505-1 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES505-1), 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。

测定步骤:

- 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 试剂配制:
 - 工作液的配制: 将 AK505-B 全部倒入 AK505-A 瓶中, 充分溶解, 置 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 10 分钟; 用不完的试剂分装后 -20℃ 保存, 禁止反复冻融。
 - 在 AK505-C 中加入 500μL 蒸馏水, 充分混匀待用; 用不完的试剂分装后 -20℃ 保存, 禁止反复冻融。
- 样本测定 (在微量石英比色皿或 96 孔板中加入下列试剂)

试剂名称	测定管 (ul)

样本	5
AK505-C	5
工作液	190
立即混匀，加入最后一个试剂的同时开始计时，记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 5min20s 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。	

GAPDH 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按样本蛋白浓度计算

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

$$\text{GAPDH (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本鲜重计算

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

$$\text{GAPDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：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。

$$\text{GAPDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.572 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.005 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按样本蛋白浓度计算

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

$$\text{GAPDH (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 2572 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本鲜重计算

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

$$\text{GAPDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2572 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：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。

$$\text{GAPDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 5.144 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.005 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。