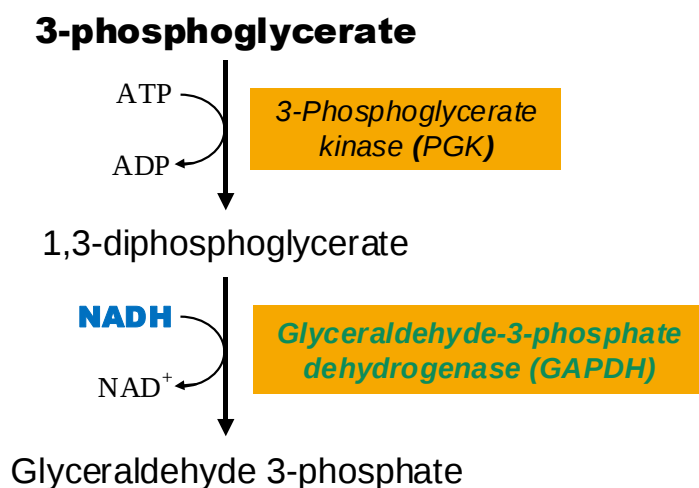




3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）活性检测试剂盒

Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）活性检测试剂盒

Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Activity Assay Kit

一、产品描述

3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）能够催化 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（PKG）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^+ ，340 nm 处测定 NADH 的变化速率即可表征 GAPDH 活性。

二、产品内容

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	-
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂三	液体 12 μL ×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 0.4 mL 蒸馏水充分混匀 (或根据使用量按比例现用现配)

工作液的配制：将试剂二全部倒入试剂一瓶中充分溶解，未使用的试剂分装后-20°C 保存，禁止反复冻融。

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、恒温水浴/培养箱、台式离心机、可调式移液器、研钵/匀浆器和蒸馏水。

1. 样品处理

①细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量(10^4 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 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），4°C 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）：直接检测。

2.测定步骤

- ①紫外分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。
- ②使用前根据使用量取用工作液，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）预热 10 min。
- ③在微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
待测样本	6	-
蒸馏水	-	6
试剂三	4	4
工作液	190	190

- 吸光值测定：**①立即混匀并开始计时，测定 10 s 时 340 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；
- ②比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴或培养箱中，准确反应 300 s，迅速取出比色皿并擦干，测定 310 s 时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；
- ③计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。

3.3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）活力计算

3.1 使用微量石英比色皿进行测定的计算

- ①按组织样本蛋白浓度计算

单位定义：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。

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

- ②按组织样本鲜重计算

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

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

- ③按照细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 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。

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

- ④按血清（浆）体积计算

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

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

注释：V样：反应体系中样本体积， 6×10^{-3} mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；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，1 cm；Cpr：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：300 s=5 min；500：细菌或细胞总数，500万； 10^9 ：单位换算系数，1 mol= 10^9 nmol。

3.2 使用 96 孔 UV 板进行测定的计算

将上述公式中的 d-1 cm 改为 d-0.5 cm（96 孔 UV 板光径）进行计算即可。

四、注意事项

- ①准确在 10 s 和 310 s 处完成读数，以保证实验结果的准确性；
- ②空白管只需做 1-2 次，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；
- ③若 A1 测定小于 0.8 或 ΔA 大于 0.7 时（96 孔板为 A1 测定小于 0.4 或 ΔA 大于 0.4），建议将样品稀释后再进行测定，计算时乘以相应的稀释倍数；
- ④比色皿中反应液的温度必须保持 37°C 或 25°C，可取烧杯装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°C 或 25°C 水浴中，在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

