

3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 活性检测试剂盒 (紫外分光光度法)

产品货号: BA1001

产品规格: 25管/24样/50管/48样

产品简介

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。

产品内容:

试剂名称	25管/24样	50管/48样	保存条件
提取液	液体30mL×1瓶	液体60mL×1瓶	4℃
试剂一	粉剂×1瓶	粉剂×1瓶	-20℃
试剂二	液体25mL×1瓶	液体50mL×1瓶	4℃
试剂三	液体15μL×1瓶	液体30μL×1瓶	4℃

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。

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 (仅供参考):

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 (μL)	空白管	测定管
样本		30
蒸馏水	30	



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

试剂三	20	20
工作液	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℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）水浴5min，拿出迅速擦干测定5min10s时的吸光值A2，计算 $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}$ 。（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。

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

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。

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

4. 按照血清（浆）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。

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

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，蛋白浓度需自行测定； 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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>