

## 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)活性检测试剂盒（微量法）

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定。

产品货号：BA1002

产品规格：100管/96样

### 测定意义：

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。

### 测定原理：

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GADPH活性的高低。

### 需自备的仪器和用品：

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。

### 试剂的组成和配制：

- 提取液：100mL×1 瓶，4℃保存；
- 试剂一：粉剂×1 瓶，-20℃保存；
- 试剂二：液体20mL×1 瓶，4℃保存；
- 试剂三：液体×1 支，4℃保存。

### 样本的前处理：

- 1、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（ $10^4$  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。
- 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0.1g组织，加入1mL提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

### 测定步骤：

- 1、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。
- 2、样本测定
  - （1）工作液的配制：将试剂二全部倒入试剂一瓶中，充分溶解，37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)预热10分钟；现配现用。
  - （2）在试剂三中加入500μL蒸馏水，充分混匀待用；用不完的试剂4℃保存一周。
  - （3）在微量石英比色皿或96孔板中加入5μL 样本、5μL试剂三和190μL工作液，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  $\Delta A=A1-A2$ 。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

### 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1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每g组织每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每1万个细菌或细胞每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{GAPDH (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 2.57 \times \Delta A\end{aligned}$$

V反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  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, 1mL; 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1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每g组织每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每1万个细菌或细胞每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

V反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  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, 1mL; 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com