

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



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

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

蒸馏水	30	
试剂三	20	20
工作液	950	950
<p>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ΔA测定管=A1测定-A2测定，ΔA空白管=A1空白-A2空白，ΔA=ΔA测定管-ΔA空白管。(空白管只需做1-2次)</p>		

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。

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

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10⁴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，6.22×10³L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应体系总体积，0.001L；V样：反应体系中样本体积，0.03mL；V样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：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；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol

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

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

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com