



3-磷酸甘油醛脱氢酶活性检测试剂盒

GAPDH Assay Kit

紫外分光光度法

产品编号：AK505U

产品规格：50T/48S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES505-1	50mL×1 瓶	4℃保存；
ES505-2	50mL×1 瓶	4℃保存；
AK505-A	粉剂×1 瓶	-20℃保存；
AK505-B	50mL×1 瓶	4℃保存；
AK505-C	28μL×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、1 mL 石英比色皿、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、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 (10⁴ 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 1mL 石英比色皿中加入下列试剂）

试剂名称	测定管 (ul)
样本	30
AK505-C	20
工作液	950
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：

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。

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

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。

$$\text{GAPDH (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1072 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{GAPDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.144 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} 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，0.03 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。