

3-磷酸甘油醛脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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 GAPDH 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：

提取液一：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

提取液二：液体 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 14uL×1 支，4℃保存；

组织样本的前处理：

①总 GAPDH 酶提取：建议称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液一，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。

②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 提取液一），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 提取液二，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）：提取液一（mL）为 500~1000:1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液一），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:

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; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融。

(2) 在试剂三中加入 500 μL 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。

(3) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 5 μL 样本、5 μL 试剂三和 190 μL 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

(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。

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

(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。

$$\text{GAPDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.572 \times \Delta A$$

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, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.005 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。

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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

(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。

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

(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。

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

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: 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, 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。
