



3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)活性检测试剂盒说明书

分光光度法

正式测定前务必取 2-3个预期差异较大的样本做预测定

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、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

- 提取液：60mL×1 瓶，4℃保存；
- 试剂一：粉剂×1 瓶，-20℃保存；
- 试剂二：液体 50mL×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1mL蒸馏水，充分混匀待用；用不完的试剂 4℃保存一周。
 - (3) 在1mL石英比色皿中加入30 μ L样本、20 μ L试剂三和950 μ L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

(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。

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

(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1万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。

$$\text{GAPDH (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 2.14 \times \Delta A$$

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。