

3-磷酸甘油醛脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)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。

组成:

产品名称	PSS004-25T/24S	PSS004-50T/48S	Storage
提取液一	25ml	50ml	4°C
提取液二	25ml	50ml	4°C
试剂一: 粉剂	1 瓶	1 瓶	-20°C
试剂二: 液体	25ml	50ml	4°C
试剂三: 液体	14 μ l	28 μ l	4°C
说明书	一份		

自备仪器和用品:

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

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°C, 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°C, 200g 离心 5min, 弃沉淀, 取上清在 4°C, 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

最终解释权所有 © 伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司, 保留一切权利



(冰浴, 200W, 破碎 3s, 间歇 7s, 总时间 1min), 然后 4°C, 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 (10^4 个): 提取液一体积 (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°C 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°C(哺乳动物)或 25°C(其它物种)预热 10 分钟; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融。

(2) 在试剂三中加入 500 μ L 蒸馏水, 充分混匀待用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融。

(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。

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

(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。

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

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。

