

## 辅酶II NADP(H)含量测定试剂盒(分光光度法)

分光光度法 100 管/96 样

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	PSS005-100T/96S	Storage
提取液一：液体	100ml	4°C
提取液二：液体	100ml	4°C
试剂一：液体	1 瓶	-20°C
试剂二：粉剂	20ml	4°C
试剂三：粉剂	14μl	4°C
说明书	一份	

### 自备仪器和用品：

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。

### 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°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 $\mu$ 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) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 5 $\mu$ l 样本、5 $\mu$ l 试剂三和 190 $\mu$ 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:

#### 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。

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

$V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm;  $d$ : 比色皿光径, 1cm;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.005 ml;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1 ml;  $T$ : 反应时间, 5 min;  $\text{Cpr}$ : 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。

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

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



(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， $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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。

